



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de doctorado: PSICOLOGÍA

Papel de la neocorteza en la Habitación de la Neofobia Gustativa

ALEJANDRO NAVARRO EXPÓSITO

Tesis doctoral
Granada, 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Alejandro Navarro Expósito
ISBN: 978-84-1306-806-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/67864>



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Instituto de Neurociencias “Federico Olóriz”

Tesis Doctoral

Programa de doctorado: PSICOLOGÍA

Papel de la neocorteza en la Habitación de la Neofobia Gustativa

ALEJANDRO NAVARRO EXPÓSITO

Granada, 2020

Directora:

Milagros Gallo Torre

Financiación

Esta Tesis Doctoral es fruto del trabajo de investigación realizado gracias a la financiación recibida para los siguientes proyectos:

- PSI2014-57643-P “Circuitos cerebrales y mecanismos moleculares responsables de la memoria de reconocimiento gustativa: efectos de la edad y de la dieta” (MINECO, Ministerio de Industria, Economía y Competitividad, España).

IP: Milagros Gallo Torre.

- PSI2917-86381-P “The adolescent brain and the attenuation of taste neophobia: epigenetic effect of early experience” MINECO, Ministerio de Industria, Economía y Competitividad, España).

IP: Milagros Gallo Torre.

- BES-2015'072307 Ayudas para la Formación de Profesional Investigador asociada al proyecto PSI2014-57643-P. (MINECO, Ministerio de Industria, Economía y Competitividad, España).

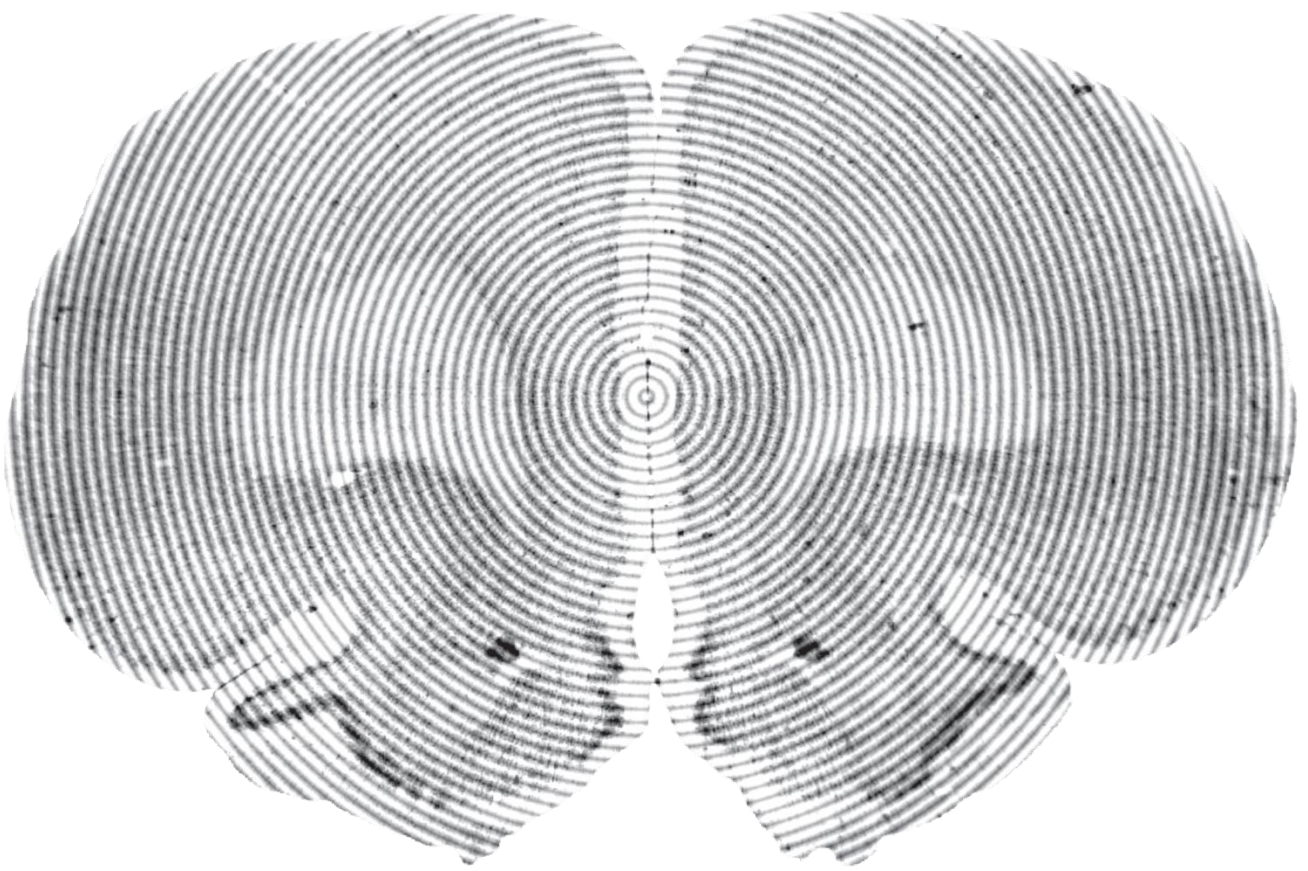
Beneficiario: Alejandro Navarro Expósito

*“Once you begin to appreciate the structure of the mind,
there's no reason anything about us can't be changed. Pain
can be destroyed. The mind can be solved.”*

Dr. Mantleray – Maniac

Papel de la neocorteza en la habituación de la neofobia gustativa

Resumen



La memoria de reconocimiento y los circuitos cerebrales que la sustentan sufren modificaciones desde etapas tempranas del desarrollo hasta el envejecimiento. La exposición repetida a un sabor exento de consecuencias negativas le convierte en un sabor familiar categorizado como seguro y atenúa la respuesta neofóbica inicial. Por una parte, la atenuación de la neofobia gustativa es un buen modelo para el estudio de la formación de la memoria de reconocimiento de sabores y su evolución a lo largo de la vida. Por otra parte, la respuesta neofóbica y su atenuación están asociadas a cambios en la actividad neuronal de las diferentes áreas que conforman el circuito de la memoria de reconocimiento de sabores seguros. Estudios previos empleando determinación inmunohistoquímica de la proteína c-Fos, producto del gen de expresión temprana c-fos, han revelado cambios en la actividad de amígdala, corteza perirhinal, corteza piriforme y núcleo accumbens durante el proceso de atenuación de la neofobia gustativa. Debido a las conexiones compartidas entre la corteza prefrontal medial y varias de estas áreas, además de la evidencia previa que apoya un papel de la corteza prefrontal medial en tareas de memoria de reconocimiento visual, resulta de especial interés explorar las alteraciones de la actividad de la corteza prefrontal medial durante la formación de la memoria de reconocimiento gustativa a lo largo de la atenuación de la neofobia y el efecto de la edad.

La presente tesis presenta combina el análisis del comportamiento y del sistema nervioso con una aproximación de desarrollo. El objetivo es investigar los cambios en la memoria de reconocimiento gustativa durante la adolescencia y el envejecimiento, así como la participación de la corteza prefrontal medial.

En el **capítulo 1** se presenta una revisión actualizada de los conocimientos existentes en el tema y en el **capítulo 2** se detallan los objetivos de la tesis y su justificación.

En la serie experimental expuesta en el **capítulo 3** se evaluaron mediante determinación inmunohistoquímica de c-Fos los cambios en la actividad neuronal de las distintas subregiones que conforman la corteza prefrontal medial durante el proceso de atenuación de la neofobia gustativa a una solución de vinagre (3%) en ratas adultas (5 meses) y envejecidas (24 meses). El análisis comportamental mostró una atenuación de la neofobia enlentecida en el grupo de ratas envejecidas frente a las adultas. Los análisis inmunohistoquímicos mostraron mayor actividad de las subregiones prelímbica e infralímbica durante la segunda presentación del sabor frente a la primera y sexta exposición. Un patrón de actividad similar se encontró en la corteza peduncular dorsal. Sin embargo, no se hallaron cambios en la actividad neuronal en la corteza cingulada anterior. En las cortezas prelímbica e infralímbica de ratas

envejecidas se observó un patrón de actividad similar al de ratas adultas, aunque el nivel de actividad se redujo. Al contrario, en la corteza peduncular dorsal se encontró una mayor actividad durante la primera presentación del sabor novedoso, viéndose reducida durante la segunda exposición y drásticamente reducida durante la sexta presentación del sabor. Estos resultados sugieren la participación de la corteza prefrontal medial en la formación de la memoria de reconocimiento de sabores. Además, los resultados muestran efectos del envejecimiento, siendo la corteza peduncular dorsal la más afectada por la edad.

La serie experimental expuesta en el **capítulo 4**, consta de cuatro experimentos centrados en la exploración de los cambios comportamentales que ocurren durante la adolescencia en la formación de la memoria de reconocimiento de sabores seguros. Se utilizaron ratas en período adolescente (PND28 al PND42) y ratas adultas (3 meses). En el experimento 1 se aplicó un procedimiento de atenuación de la neofobia gustativa a una solución de vinagre (3%). Los resultados mostraron una respuesta neofóbica igual en adolescentes y adultas. Sin embargo, las ratas adolescentes manifestaron un retraso en la aceptación de la solución ácida de vinagre como segura. En el segundo experimento de esta serie se empleó el mismo procedimiento, esta vez con una solución dulce no calórica de Sacarina (0,1%). Los resultados no mostraron

diferencias en la respuesta neofóbica ni en la atenuación de la neofobia al sabor entre ratas adolescentes y adultas.

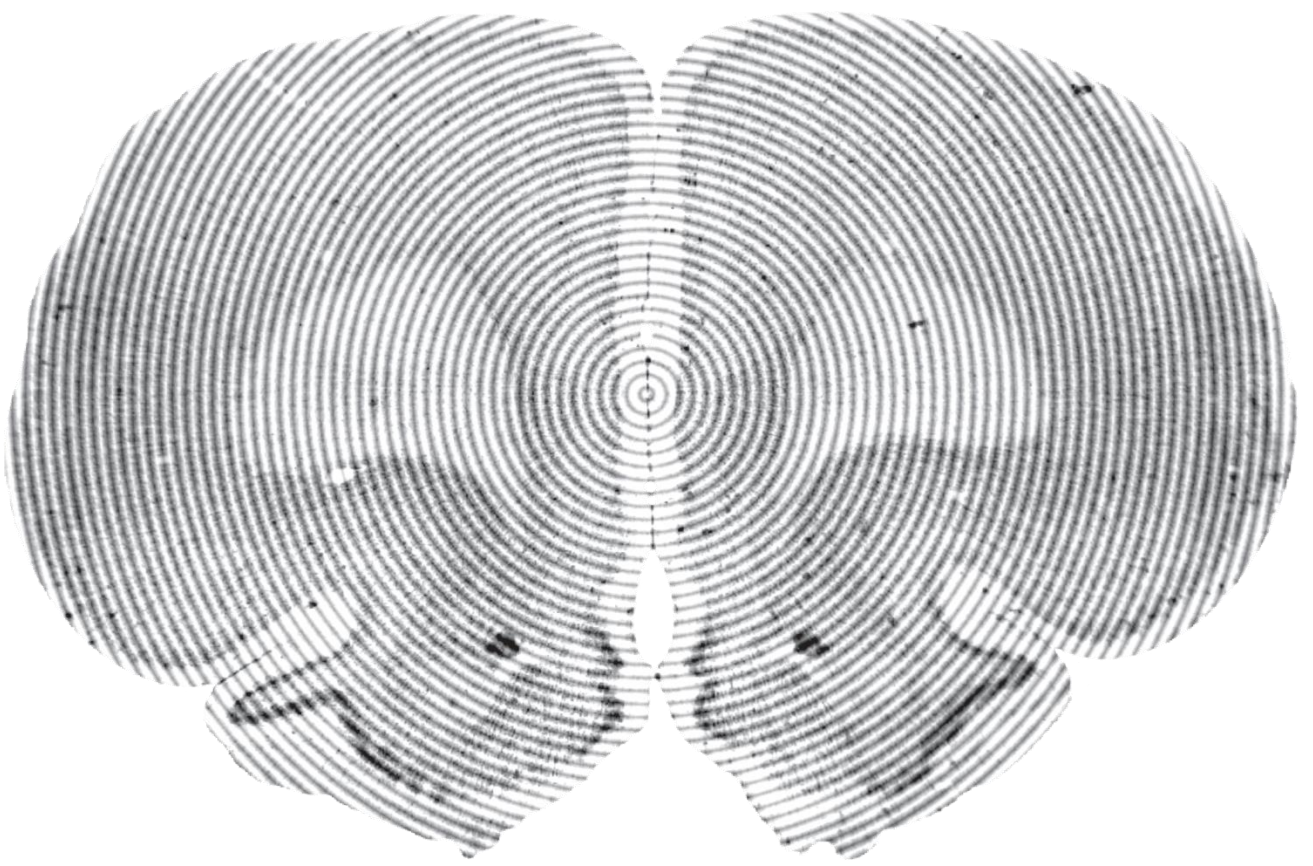
Los resultados del experimento 1 y 2 sugieren que durante la adolescencia existe una mayor sensibilidad a las posibles propiedades estresantes de estímulos gustativos menos palatables, como es el caso del vinagre. Adicionalmente, para verificar que los resultados no son atribuibles a déficits inespecíficos en la formación de la memoria de reconocimiento, en los experimentos 3 y 4 se aplicaron tareas de inhibición latente y reconocimiento de objetos novedosos. Tanto las ratas adolescentes como las adultas mostraron una ejecución similar en dichas tareas.

En conjunto, los resultados de esta tesis muestran la implicación de la corteza prefrontal medial en la formación de la memoria de sabores seguros y cómo la actividad neuronal de las distintas subregiones que la conforman se ve alterada durante el envejecimiento. Además, durante la adolescencia no existen déficits en la formación de la memoria de reconocimiento de sabores, aunque parece haber una mayor sensibilidad a las propiedades aversivas de estímulos menos palatables como ocurre con el vinagre.

Seguidamente, el **capítulo 5** incluye una discusión general de los resultados obtenidos en los capítulos anteriores.

Para finalizar, en el **capítulo 6** se recapitulan las conclusiones extraídas de esta tesis doctoral.

Abstract



Recognition memory and the brain circuits involved on it change from early developmental stages to aging. Repeated exposures to tastes not followed by negative consequences became familiar and safe, thus, attenuating the initial neophobic response. First, the attenuation of taste neophobia is a good model to study the formation of taste recognition memory and its developmental changes. Second, previous reports applying immunohistochemical determination of the c-Fos protein, product of the immediate early c-fos gen, have revealed changes in the activity of Amygdala, Perirhinal Cortex, Piriform Cortex and Nucleus Accumbens along the attenuation of taste neophobia. Given the shared neural connections between the medial Prefrontal Cortex and some of these areas together with the previous evidence supporting a role of the medial Prefrontal Cortex in visual recognition memory, it is relevant to explore the medial Prefrontal Cortex activity changes during the formation of taste recognition memory through the attenuation of neophobia process as well as the effect of aging.

The present doctoral thesis combines the nervous system and behavioral analysis with a developmental approach. The main aim is to investigate the taste recognition memory changes during adolescence and aging as well as the medial Prefrontal Cortex involvement.

The **first chapter** includes a review of the previous knowledge in the field and in the **second chapter** the specific objectives are justified.

In the experimental series presented in **chapter 3**, the changes in the neuronal activity of the different subregions that conform the medial Prefrontal Cortex were evaluated during the process of Attenuation of Taste Neophobia to a vinegar solution (3%) by applying c-Fos immunohistochemical technique in adult (5 months) and aged (24 months) rats. The behavioral analysis showed a slowed attenuation of neophobia in the aged group compared to the adult group of rats. The Immunohistochemical analyses showed that Prelimbic and Infralimbic subregions exhibit higher activity during the second taste presentation compared to the first and sixth exposure. A similar activity pattern was found in the Peduncular Cortex. However, no changes in neuronal activity were shown in the Anterior Cingulate Cortex. In the Prelimbic and Infralimbic cortex of aged rats a similar activity pattern was observed compared with adults. However, the level of activity was reduced. On the contrary, the Peduncular Cortex showed a higher activity during the first exposure of the taste, being reduced during the second exposure and drastically reduced during the sixth exposure in the aged rats group compared to the adult one.

The experimental series presented in **Chapter 4** consist of 4 experiments aimed to explore the behavioral changes that occur during adolescence in the safe taste recognition memory formation. Adolescent (PND28 to PND42) and adult (3 months) rats were used. In the experiment 1, attenuation of taste neophobia to a vinegar solution (3%) was studied. The results showed the same neophobic response in adolescent and adults groups. However, adolescent rats required more exposure to accept the acid vinegar solution as safe. In the second experiment of this series, the same procedures were used but this time with a non-caloric sweet saccharin (0.1%) solution. The results showed no differences between adolescent and adult rats neither in the neophobic response nor in the attenuation of taste neophobia.

Taken together, the results of experiments 1 and 2 suggest that during adolescence there is a greater sensitivity to the potential stressful properties of less palatable taste stimuli such as vinegar. Additionally, in order to verify that the results are not attributable to non-specific deficits in the recognition memory formation, in the experiments 3 and 4 a Latent Inhibition and Novel Object Recognition tasks were applied. Both adolescent and adult rats showed similar performance on these tasks.

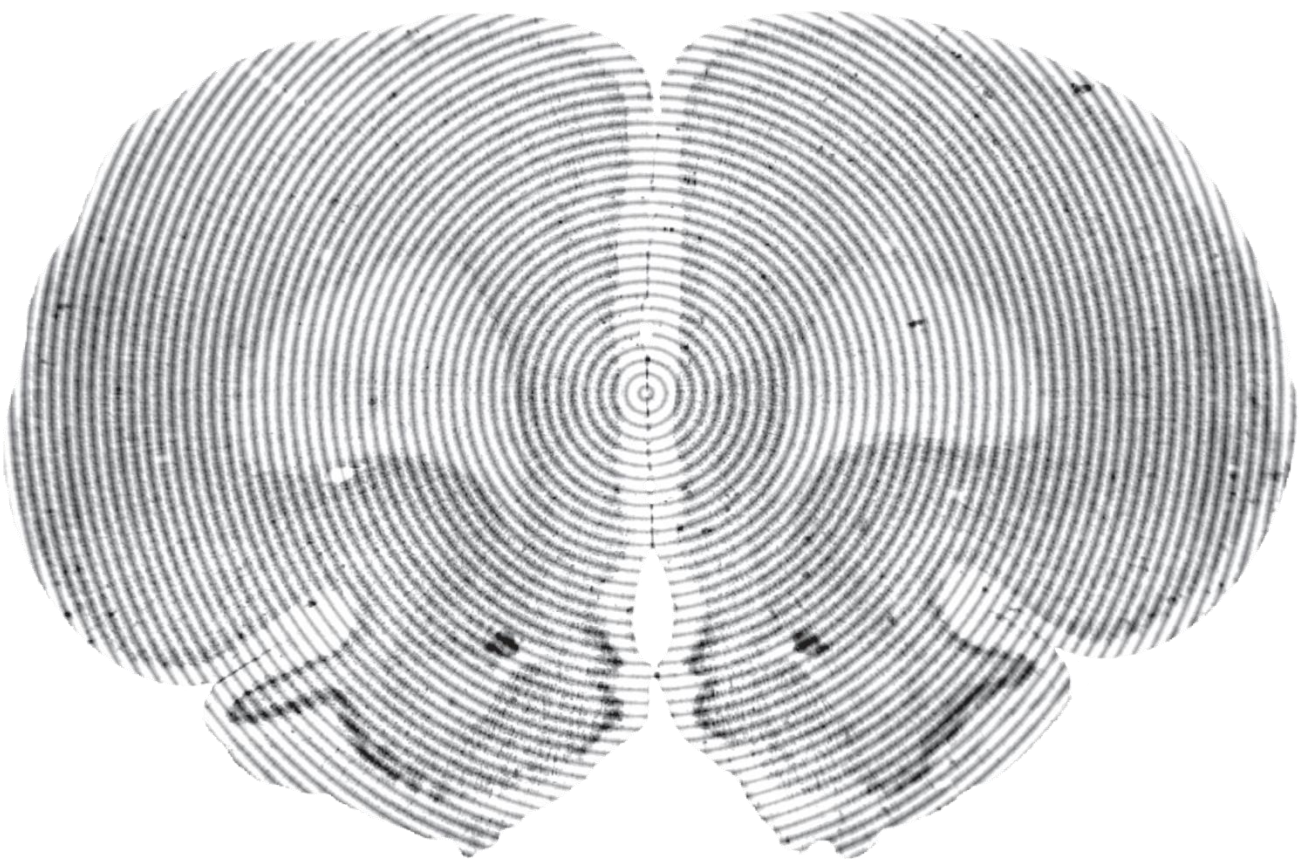
In all, the results of this doctoral thesis suggest the involvement of the medial Prefrontal Cortex in the formation of safe taste

memory and that the neuronal activity pattern of the different subregions is altered during aging. In addition, during adolescence there are no deficits in the formation of the taste recognition memory formation, although there seems to be a greater sensitivity to the aversive properties of less palatable stimuli such as vinegar.

A general discussion of the results obtained in the previous chapters is included in **Chapter 5**.

Finally, **Chapter 6** summarizes the general conclusions drawn from this doctoral thesis.

Índice

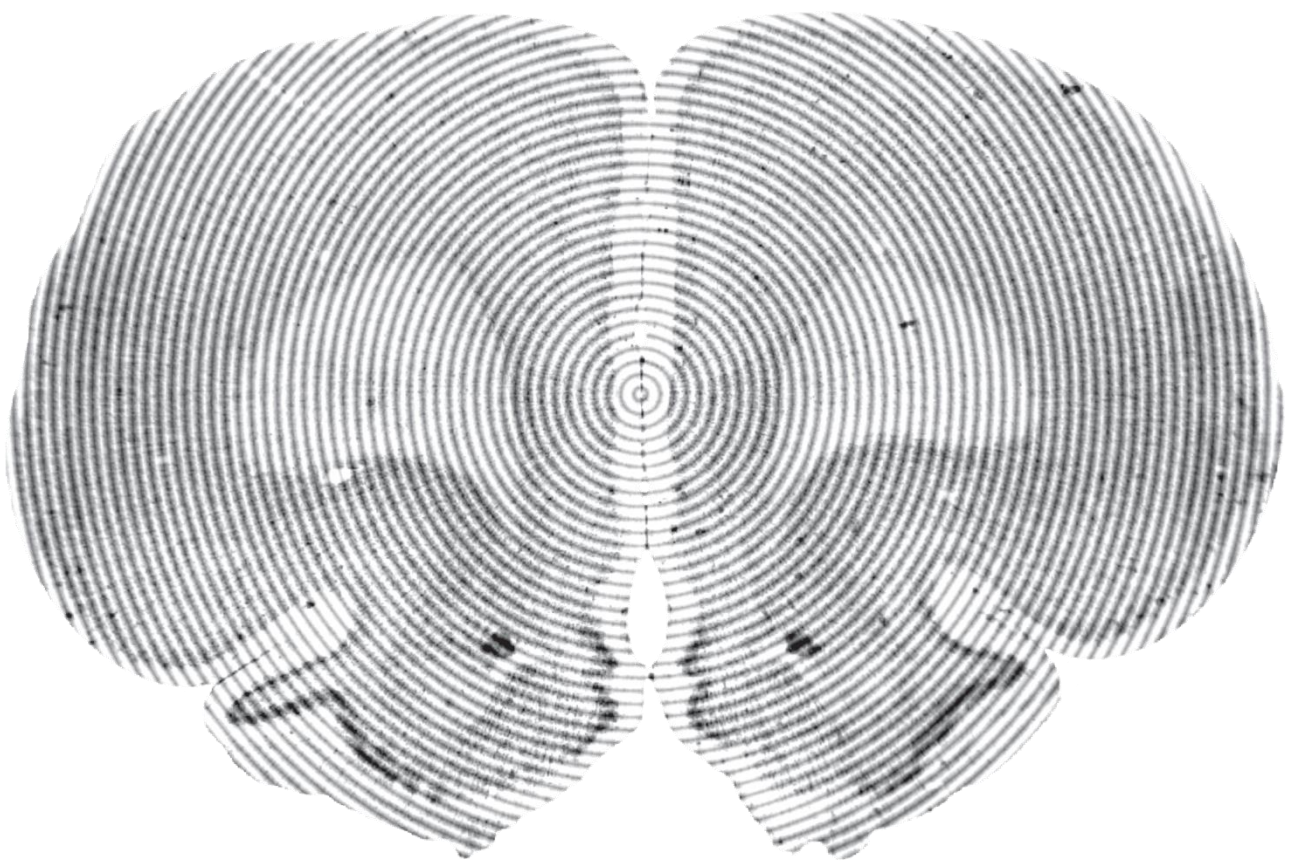


Financiación	7
Resumen	13
Abstract	21
Capítulo 1	31
1. Respuesta a la novedad a lo largo de la vida	33
2. Estudio de la novedad y familiaridad en el laboratorio	39
2.1. Memoria de reconocimiento de visual (ORM)	39
2.2. Memoria de reconocimiento gustativa	40
3. Mecanismos cerebrales de Atenuación de la Neofobia en adultos	44
3.1. Neuroanatomía del sistema gustativo	45
3.2. Neuroanatomía de la memoria de reconocimiento de sabores	46
3.3. Organización anatómica y funcional de la corteza prefrontal medial	51
4. Envejecimiento y neofobia gustativa	58
4.1. Efecto del envejecimiento sobre la respuesta neofóbica en el ser humanos	58
4.2. Efecto de la edad sobre la respuesta neofóbica en modelos animales	62
4.3. Cambios cerebrales asociados a la edad	63
5. Adolescencia y neofobia gustativa	65
5.1. Búsqueda de la novedad y conductas de riesgo	66
5.2. Maduración cerebral durante la adolescencia	69
5.3. Adolescencia y memoria de reconocimiento visual	71
5.4. Adolescencia y memoria de reconocimiento de sabores	73
Capítulo 2	75
1. Justificación	77
2. Objetivos e hipótesis	82
Capítulo 3	85
1. Abstract	87
2. Introduction	89
3. Method	93
3.1. Subjects and procedure	93
3.2. c-Fos Immunohistochemistry	94
3.3. Cell quantification	95
4. Results	96
5. Discussion	101
6. Acknowledgments	104

Capítulo 4	105
1. Abstract	107
2. Introduction	109
3. Experiment 1	114
3.1. Method	115
3.2. Results	117
4. Experiment 2	120
4.1. Method	121
4.2. Results	122
5. Experiment 3	125
5.1. Method	127
5.2. Results	129
6. Experiment 4	131
6.1. Method	133
6.2. Results	135
7. Discussion	136
8. Acknowledgments	142
Conclusiones	161
Conclusions	167
Bibliografía	173
Publicaciones directamente relacionadas con la tesis	195
Otras publicaciones	196
Índice de abreviaturas:	201
Abbreviation index:	203
Índice de figuras y tablas:	205

Capítulo 1

Introducción



1. Respuesta a la novedad a lo largo de la vida

Seguramente, el aspecto más reconocido popularmente de lo que llamamos memoria es la metáfora que la concibe como un sistema de almacenaje, un archivador repleto de información adquirida durante la experiencia vital cuya función es poder recuperarla en situaciones que lo requieran. Sin embargo, las experiencias no se almacenan únicamente, sino que modifican la percepción, los procesos cognitivos y el comportamiento. En este sentido la capacidad para detectar, evaluar e integrar información novedosa juega un papel esencial. Dicha capacidad contribuye a la formación de la memoria de reconocimiento (Kafkas & Montaldi, 2018) ya que está íntimamente ligada a la habilidad para identificar un estímulo o situación experimentados previamente como familiares.

Estudios neuropsicológicos, cognitivos y de neuroimagen reflejan que la memoria de reconocimiento está conformada por dos procesos distintos de memoria, el recuerdo y la familiaridad (Yonelinas, 2002). Mientras el recuerdo implica consciencia en el ser humano, este no necesita de ensayos repetidos, haciendo referencia a un tipo de memoria declarativa, la memoria episódica de acuerdo con la clasificación de Squire (2004). Por otro lado, la familiaridad no requiere consciencia en el ser humano y sí necesita de ensayos repetidos reflejando un proceso de

habitación, que reduce la respuesta ante la novedad de un estímulo y se asienta como aprendizaje no asociativo, formando parte de la llamada memoria no declarativa (Squire, 2004). Efectivamente, la detección de la familiaridad implica la habitación de la respuesta ante un estímulo novedoso. Por su parte, la novedad es una cualidad que atribuimos a un estímulo cuando éste no posee una representación pre-existente en nuestra memoria. Tras repetidas exposiciones al estímulo perderá la condición de novedad gracias a una rápida adaptación de los circuitos encargados de su detección y adquirirá la condición de familiar (Murty et al., 2013; Osorio-Gómez et al., 2018).

La novedad de un estímulo o una situación desencadena una serie de procesos estrechamente relacionados entre sí como la atención, el aprendizaje y la memoria. Ciertamente, reconocer un estímulo como novedoso requiere dirigir la atención hacia éste, aprender sobre sus características y retenerlo en la memoria a largo plazo (Gallo, 2018).

Todo este proceso de detección de la novedad tiene un gran valor adaptativo y cumple su función como mecanismo básico de supervivencia. Empleando como ejemplo la modalidad gustativa, imaginemos que un animal se encuentra con un comestible que nunca antes ha probado. Ante la potencial amenaza para su supervivencia que conlleva, ya que las consecuencias de su ingesta son desconocidas, éste

inicia la exploración cautelosa de las diferentes características del comestible. En este caso, ha detectado la novedad, es decir que no existe una representación previa en su memoria. Al explorar este nuevo alimento estudiará sus características, tacto, forma, color, olor y las comparará con otros que ya ha consumido. El último paso será ingerir una cantidad reducida y esperar las consecuencias que tendrá su ingesta. Al probarlo percibirá su sabor, que, al ser un alimento, será la característica más relevante. Si tras la digestión de este alimento siente malestar gastrointestinal asociará las propiedades de este alimento con las consecuencias aversivas y en próximos encuentros este se habrá convertido en aversivo y lo evitará. Si, por el contrario, su ingesta es seguida de consecuencias negativas, este alimento se convertirá en seguro y si vuelve a encontrárselo podrá alimentarse de él. En ambos casos, este estímulo ya será reconocido como familiar. Así, la detección de la novedad tiene un importante valor adaptativo a lo largo de la vida. Durante las distintas etapas, tanto prenatales como postnatales, adolescencia, adultez y envejecimiento, la relevancia de interactuar con estímulos novedosos sigue presente.

Tal y como se ha descrito, la respuesta ante la novedad forma parte del aprendizaje y juega un rol fundamental en conductas creativas, exploratorias y de riesgo a lo largo de la vida (Reio & Choi, 2010). Se ha

demostrado que desde estados prenatales ya existe la habilidad de reconocer olores que se vuelven familiares antes del nacimiento, como por ejemplo en el estudio de Pedersen and Blass (1982) en el que mostraron que las claves olfativas del líquido amniótico son recordadas postnatalmente y juegan un papel esencial en la supervivencia del recién nacido ya que permite reconocer y buscar la zona mamaria de la madre en el primer episodio de lactancia.

Más adelante, durante la adolescencia, la exploración de iguales, entornos y alimentos novedosos se convierte en una conducta necesaria para alcanzar la independencia adulta. Por ello, esta etapa está marcada por un comportamiento peculiar en el que se ve incrementada la búsqueda de novedad (Spear, 2000).

La reacción a la novedad durante el envejecimiento parece continuar conservada, incluso potenciada, debido a la existencia de experiencias previas con gran número de estímulos y situaciones lo que hace más singular e imprevista la novedad. Así a edades avanzadas, en ausencia de patologías, se mantienen las respuestas hacia la novedad intactas e incluso incrementadas. Un estudio llevado a cabo por Morón & Gallo (2007) empleando la modalidad gustativa encontró que ratas adultas y envejecidas con experiencia previa con otros sabores mostraban respuesta neofóbica a un sabor desconocido, presentando

mayor sensibilidad a la novedad las ratas envejecidas tras haberse visto sometidas previamente a aversiones gustativas. Sin embargo, existen datos de nuestro laboratorio que muestran que las ratas envejecidas necesitan un mayor número de exposiciones que las adultas para que el sabor novedoso se convierta en familiar y seguro (Gómez-Chacón et al., 2015; A. B. Grau-Perales et al., 2019a; E. Morillas et al., 2017).

En conjunto, toda esta evidencia sugiere que las experiencias con estímulos novedosos son procesadas de forma distinta a lo largo de la vida. Es relevante resaltar que la detección de la novedad y familiaridad tendrá que ser construida en función de sus propiedades sensoriales. El ejemplo del comestible implica que ese estímulo posee diversas características, tales como su color, textura o sabor y es por ello adaptativo poder recordar la información sobre las diferentes características de este alimento para facilitar su reconocimiento frente a posibles encuentros posteriores con el mismo y poder distinguirlo de otros similares. Un estímulo está conformado por distintas características sensoriales que corresponden con las distintas vías de recepción de información del entorno, ya sean visuales, auditivas, olfativas, táctiles o gustativas. Sin embargo, las situaciones estimulares no aparecen naturalmente de forma uni-sensorial, es decir, con sólo una modalidad sensorial, como, por ejemplo, exclusivamente auditiva, sino que suelen

ser compuestos formados por diferentes características sensoriales simultáneas, es decir, estímulos multisensoriales. Ha sido ampliamente aceptado que los estímulos multisensoriales tienen un mayor impacto en el comportamiento en comparación con estímulos uni-sensoriales (Mahoney et al., 2011). Sin embargo, en el ámbito de la investigación, mediante condiciones experimentales específicas, es posible investigar el efecto de estímulos uni-sensoriales ya sean exclusivamente visuales (Antunes & Biala, 2012), auditivos (Cohen et al., 2009) o gustativos (Gómez-Chacón et al., 2015). Esta investigación se beneficia del empleo de modelos animales que a lo largo de las últimas décadas han permitido conformar distintos modelos comportamentales de la memoria de reconocimiento empleando diferentes modalidades sensoriales.

2. Estudio de la novedad y familiaridad en el laboratorio

2.1. Memoria de reconocimiento de visual (ORM)

Tradicionalmente, el estudio de la novedad y familiaridad ha empleado preferentemente la modalidad visual, proliferando en los años 70 y 80 la investigación en primates no humanos (Mishkin & Delacour, 1975; Zola-Morgan & Squire, 1985, 1986) con las tareas de desigualación a la muestra demorada (DNMS por sus siglas en inglés) e igualación a la muestra demorada (DMS por sus siglas en inglés). Más adelante, estas fueron adaptadas como tareas de reconocimiento de objetos para roedores, en concreto la tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NOR por sus siglas en inglés) (Aggleton, 1985; Ennaceur & Delacour, 1988). Se trata de una tarea visual, aunque más adelante se han realizado

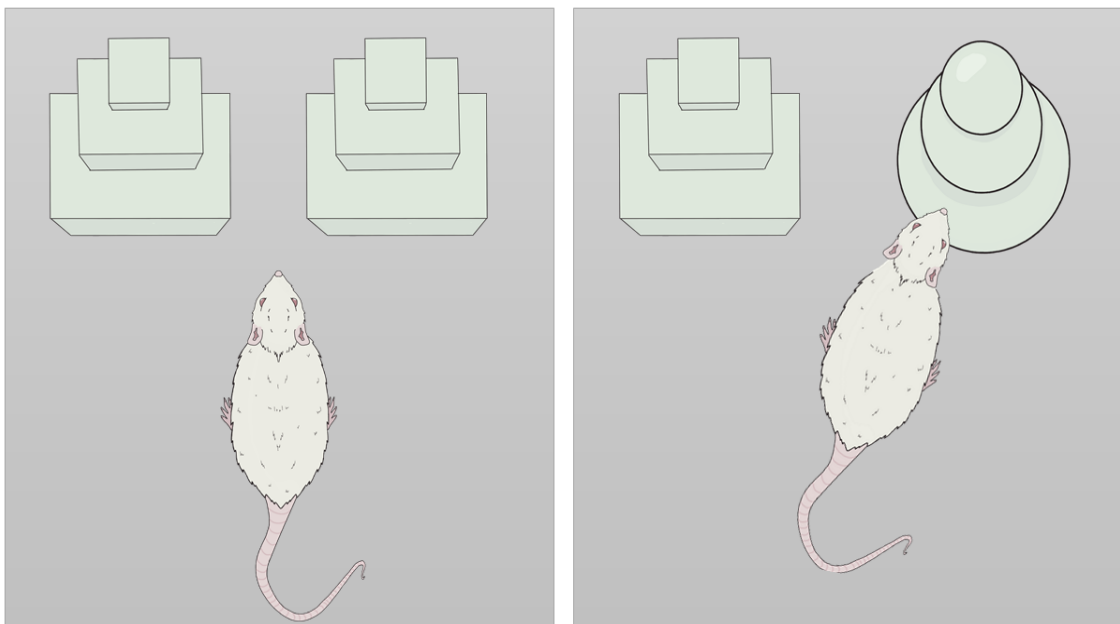


Figura 1.- Tarea de reconocimiento de objetos novedosos (ORM).

modificaciones para el estudio de la memoria de reconocimiento en otras modalidades sensoriales tales como la somatosensorial o la olfativa (Albasser et al., 2011).

El procedimiento a seguir en las tareas de NOR se basa en una primera sesión de adquisición en la que se presentan dos objetos iguales. A continuación, en una prueba de elección, tras un intervalo de retención, se presentan dos objetos, uno de los presentados anteriormente y uno novedoso (Figura 1). Durante ambas sesiones se registran las respuestas de exploración de los mismos. El tiempo de exploración del objeto novedoso será mayor en roedores sanos, siempre que el objeto familiar no haya sido seguido de consecuencias relevantes para el organismo. Esta tarea que refleja la memoria de reconocimiento de objetos ha sido habitualmente clasificada como memoria episódica o recuerdo, dependiente de hipocampo (HC), un tipo de memoria no declarativa cuya principal diferencia con las tareas de familiaridad reside en no necesitar una extensa fase de adquisición (Winters et al., 2008).

2.2. Memoria de reconocimiento gustativa

La memoria de reconocimiento gustativa implica tanto procesos que pueden clasificarse como memoria declarativa y que, por tanto, no dependen de la integridad hipocampal como características propias de la memoria declarativa, tales como la dependencia del contexto y otros

fenómenos dependientes del HC. El procedimiento experimental para el estudio de la memoria de reconocimiento de sabores se lleva a cabo aplicando una tarea que permite estudiar la respuesta neofóbica al sabor y la atenuación de la neofobia gustativa (AN). Dicha tarea, realizada inicialmente por Domjan y Gillian (1976), fue propuesta como modelo de memoria de reconocimiento de sabores en 2004 (Bermúdez-Rattoni, 2004). Esta tarea consiste en presentaciones repetidas del sabor. Ante la primera presentación de un sabor novedoso, se produce una respuesta cautelosa innata llamada neofobia que consiste en una reducción del consumo de la solución gustativa con respecto al consumo posterior, una vez que el sabor se convierte en familiar, con el fin de prevenir y evitar posibles efectos tóxicos de esta. Si tras su consumo no se producen efectos nocivos para el organismo, tal como malestar gastrointestinal, la respuesta neofóbica se atenuará y el consumo de la solución gustativa durante posteriores presentaciones se verá incrementado conforme se reconoce el sabor como seguro, creando así una memoria gustativa segura (Figura 2).

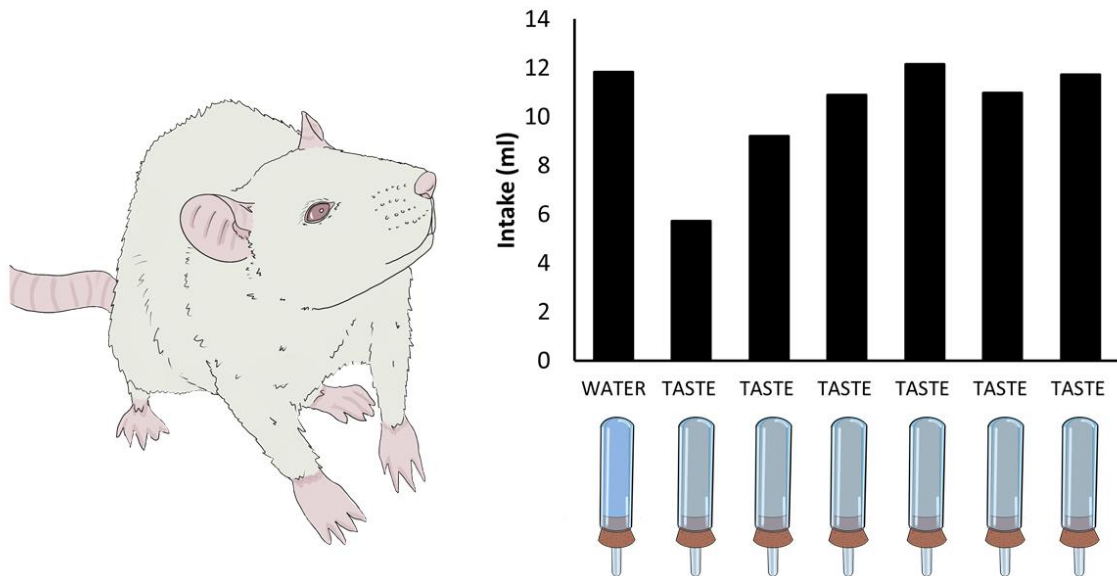


Figura 2.- Atenuación de la neofobia gustativa (AN). Procedimiento comportamental y resultados simulados.

Sin embargo, si tras la ingesta del sabor novedoso se producen consecuencias viscerales negativas, el sabor será clasificado como aversivo y se evitará su consumo en futuros encuentros. La respuesta aprendida se denomina aversión gustativa condicionada y es frecuentemente estudiada en roedores mediante una tarea de condicionamiento aversivo gustativo (CTA por sus siglas en inglés). Para llevar a cabo esta tarea, considerada frecuentemente un tipo de condicionamiento clásico, se asocia un estímulo condicionado (EC), siendo éste el sabor y un estímulo incondicionado (EI) siendo éste el malestar visceral. Tras la presentación del sabor (EC), se induce el

malestar mediante inyecciones de cloruro de litio (LiCl), rotación corporal, etc... Tras esta sesión, una vez asociados ambos estímulos, la siguiente presentación de la solución gustativa producirá un rechazo a su consumo (Figura 3). Estos dos modelos de memoria aversiva y segura al sabor parecen compartir mecanismos cerebrales, aunque algunos aspectos parecen ser específicos de cada una de ellos.

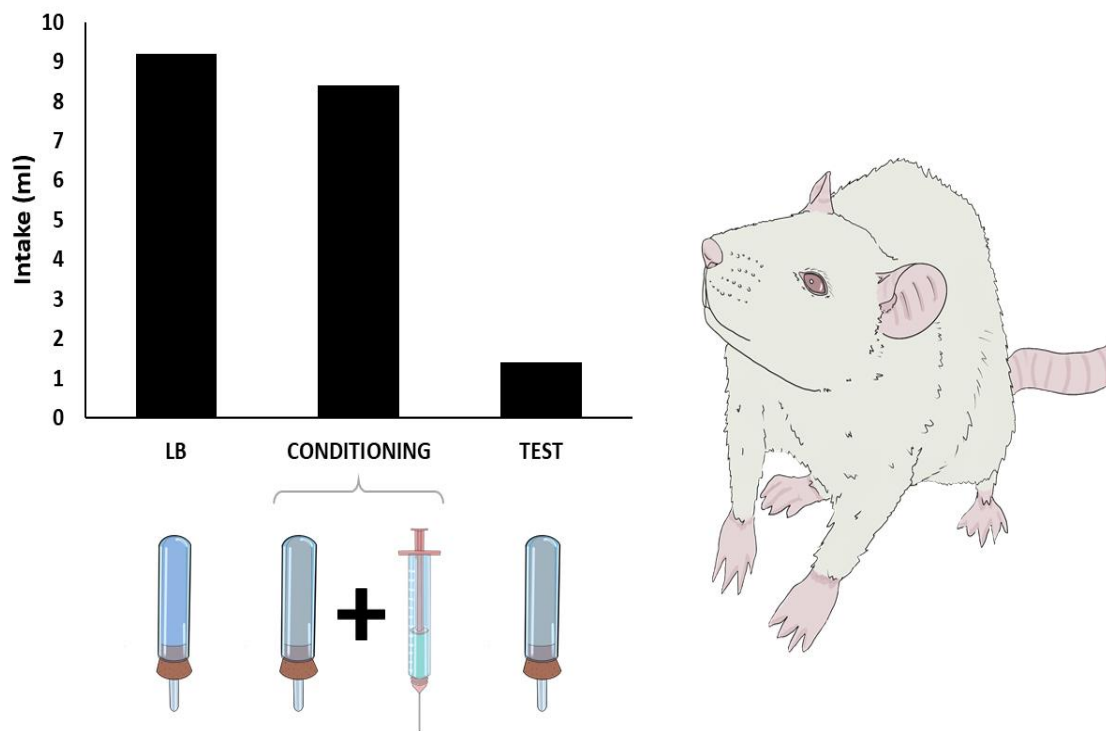


Figura 3.- Aversión condicionada al sabor (CTA). Procedimiento comportamental y resultados simulados. LB: Consumo de agua durante la línea base; Conditioning: Consumo del sabor seguido por inyección i.p. de Cloruro de Litio; Test: Consumo del sabor condicionado.

3. Mecanismos cerebrales de Atenuación de la Neofobia en adultos

Gracias a los modelos de memoria de reconocimiento revisados en el apartado anterior, tanto en su modalidad visual, como en su modalidad gustativa, se ha logrado indagar en los aspectos comportamentales y fisiológicos de la respuesta ante la novedad y la familiaridad, consiguiendo grandes avances con respecto a los circuitos cerebrales encargados de formar estas memorias.

De hecho, se ha propuesto una disociación entre los circuitos cerebrales responsables de los procesos de recuerdo y de la familiaridad que están implicados en la memoria de reconocimiento. El recuerdo no sólo implica recuperar la información del estímulo, sino también la del contexto espacio-temporal en el que se vivió la experiencia y requiere de estructuras del lóbulo temporal (Squire, 2004), especialmente el HC. El proceso de familiaridad, por su lado, requiere circuitos anatómicos que detecten la novedad y la familiaridad, como propone Yodelinas (2001), los cuales implican regiones cercanas y estrechamente relacionadas con el HC. El interés por el proceso de familiaridad de la memoria de reconocimiento es relativamente reciente. Así en las últimas décadas se ha desarrollado una importante investigación sobre los mecanismos cerebrales responsables de esta memoria en el ámbito de las

neurociencias. En este sentido, analizar las vías neuroanatómicas responsables de la memoria de reconocimiento empleando estímulos de distintas modalidades sensoriales, tales como la modalidad gustativa y visual que no comparten las vías neuroanatómicas sensoriales, permite identificar áreas selectivamente implicadas en memoria de reconocimiento independientemente de la modalidad sensorial.

3.1. Neuroanatomía del sistema gustativo.

La información sensorial sobre la comida está compuesta de diferentes estímulos químicos. Dependiendo del tipo de información que aportan se han clasificado los estímulos gustativos en cinco sabores básicos: dulce, ácido, amargo, salado y umami. Los animales reciben esta información a través del botón gustativo, conformado por las células receptoras gustativas y células de sostén. Están localizados a lo largo de la lengua, el paladar, la epiglotis, la pared posterior de la orofaringe y la laringe. El botón gustativo es el encargado de transducir la información gustativa durante la ingesta y cada célula parece responder con distinta intensidad según el tipo de estímulo (Chandrashekar et al., 2006). A continuación, los pares craneales VII (Facial), IX (Glossofaríngeo) y X (Vago) se encargan de transferir la información de los sabores desde los botones gustativos al sistema nervioso central (Yamamoto, 2006), alcanzando primero la parte rostral del núcleo del tracto solitario (NTS

por sus siglas en inglés), el cual proyecta a los núcleos posteromediales y dorsolaterales del área parabraquial (PBN por sus siglas en inglés). Posteriormente, la información gustativa alcanza distintas estructuras cerebrales tales como el hipotálamo lateral (LH por sus siglas en inglés), núcleo del lecho de la estría terminal (BNTS por sus siglas en inglés), la amígdala central (CeA por sus siglas en inglés) y basolateral (BLA por sus siglas en inglés) y la porción parvocelular del núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPMpc por sus siglas en inglés) (Osorio-Gómez et al., 2018). Finalmente el tálamo (Th por sus siglas en inglés) proyecta esta información a la corteza gustativa situada en la corteza insular (IC por sus siglas en inglés) (Bermúdez-Rattoni, 2004).

3.2. Neuroanatomía de la memoria de reconocimiento de sabores

Además de describir la vía neural que codifica la percepción de los sabores, es relevante entender las estructuras cerebrales involucradas en la memoria de reconocimiento gustativa. Bures y Buresova, en la década de 1970 iniciaron los estudios sobre la memoria de reconocimiento gustativa segura y sus sustratos neurales demostrando como diversas intervenciones cerebrales afectaban a la AN (Burešová & Bureš, 1977). A raíz de sus investigaciones, la IC tomó protagonismo durante las siguientes décadas. La IC se conforma como un área multimodal cuyas neuronas responden a diversos aspectos de la información sensorial tales

como temperatura, tacto, dolor y más importante, sabor. Ello le permite procesar e integrar la información de un alimento y compararla con información procesada previamente. Hasta el siglo XX las investigaciones llevadas a cabo sobre la IC mostraron su papel de esta área en la detección y codificación de la novedad, principalmente en tareas de CTA (Naor & Dudai, 1996; Rosenblum et al., 1993, 1995, 1997) y más adelante en AN (Bermúdez-Rattoni, 2004; Gallo et al., 1999; Lin & Reilly, 2012).

Así, ratas descerebradas antes de la fase de adquisición, son incapaces de adquirir aversiones gustativas condicionadas a pesar de mostrar respuestas orofaciales incondicionadas de aceptación; rechazo ante soluciones gustativas administradas intraoralmente (Grill & Norgren, 1978). Estos resultados iniciales dieron lugar a una interpretación errónea que situaba el locus asociativo en áreas corticales, siendo propuesta la IC gustativa como área crítica. Posteriormente, con la identificación del área parabraquial troncoencefálica como locus asociativo, (Bielavska & Bures, 1994; Bures et al., 1991; Ivanova & Bureš, 1990) se identificó el papel de la IC en el mantenimiento de la memoria gustativa durante el intervalo EC-EI (Gallo & Bures, 1991). Congruentemente, la aplicación de escopolamina, un agonista colinérgico, en esta corteza interrumpe la formación de la memoria de reconocimiento gustativa segura (Gutiérrez et al., 2003).

Tras esta primera etapa de estudio de la memoria de reconocimiento de sabores, con el protagonismo de la IC, la investigación sobre la neuroanatomía de la AN se ha beneficiado del desarrollo de diversas técnicas que han permitido explorar la actividad cerebral en sus aspectos electrofisiológicos, químicos y estructurales.

Una de las técnicas más interesantes para investigar qué áreas cerebrales juegan un rol en la memoria de reconocimiento ha sido la determinación inmunohistoquímica de la proteína c-Fos. Esta técnica permite el marcaje de neuronas que están activadas durante una conducta específica. En concreto, c-fos es un gen de expresión temprana que se expresa cuando hay actividad neuronal. Así, su marcaje, permite explorar que áreas están activadas durante la presentación de sabores novedosos o familiares. Gracias a esta técnica, varios estudios han localizado estructuras que muestran distintos niveles de actividad neuronal en diversos estadios de la formación de la memoria de reconocimiento de sabores.

En primer lugar, durante la ingesta de un sabor novedoso se ha encontrado un aumento de células c-Fos positivas en la corteza perirhinal (PrH por sus siglas en inglés) (Gómez-Chacón et al., 2015) CeA y BLA, en el tálamo gustativo, IC (Lin & Reilly, 2012) y NTS (Haupt et al., 1994). En segundo lugar, cuando el sabor se presenta por segunda vez aumenta la

actividad del núcleo accumbens shell (NAcb Sh por sus siglas en inglés) en comparación con la primera presentación del sabor o con la actividad registrada después de seis presentaciones (Grau-Perales et al., 2019a). Asimismo, cuando se aplican repetidas presentaciones del sabor se ha descrito un incremento progresivo en la actividad del núcleo ventral posteromedial del tálamo (Morillas et al., 2014). Por último, se ha descrito que cuando un sabor muy familiar ha sido presentado en repetidas ocasiones se produce un incremento de la actividad neuronal de la región rostral de la corteza piriforme posterior (pPirCx por sus siglas en inglés) (Grau-Perales et al., 2019b). En conjunto, parece existir actividad neuronal en diferentes estructuras repartidas por el encéfalo que sugieren la existencia de un circuito neuroanatómico distribuido encargado de formar esta memoria de reconocimiento gustativa.

Sin embargo, los hallazgos correlacionales obtenidos mediante técnicas de registro de la actividad neural empleando inmunohistoquímica de c-Fos no son suficientes para entender cómo intervienen estas estructuras en el fenómeno de la atenuación de la neofobia. Otros estudios de lesiones permanentes o reversibles han arrojado luz mediante la actuación directa sobre el cerebro de roedores, evaluando los cambios en la respuesta neofóbica al sabor y en el proceso de habituación a éste.

En este sentido la integridad de la amígdala (AMY por sus siglas en inglés) parece jugar un papel en la detección de la familiaridad gustativa. Lesiones electrolíticas de la BLA, al igual que de la amígdala medial (MeA), aumentan el consumo en la primera presentación de una solución de sacarina (Lin et al., 2009). Lesiones de los núcleos laterales y basolaterales amigdalinos y áreas circundantes como la PirCx lateral incrementan el consumo de un sabor novedoso en comparación con grupos controles (Fitzgerald & Burton, 1983). En conjunto, estos datos sugieren que la AMY juega un rol principal en la respuesta ante sabores novedosos.

En relación con la AMY como parte del circuito neuroanatómico de la memoria de reconocimiento de sabores seguros, diversas investigaciones muestran como áreas con conexiones directas con esta estructura también parecen jugar un rol importante en el aprendizaje de sabores. Por ejemplo, se ha reportado que lesiones en BLA producen una reducción de la expresión de c-Fos en PrH en comparación con un grupo SHAM tras ser expuestos a un sabor familiar (Gómez-Chacón et al., 2015). Además, lesiones unilaterales asimétricas de BLA e IC producen un consumo elevado de una solución novel de sacarina en comparación con sujetos controles y lesiones asimétricas de IC y MeA impiden la atenuación de la neofobia (Lin & Reilly, 2012), estos datos apoyan la

participación del lóbulo temporal medial en este tipo de memoria. Junto a la necesidad de la interacción entre la IC y AM para la adquisición y consolidación de la memoria de sabores (Lin & Reilly, 2012), también se ha identificado la existencia de interacciones con otras áreas que reciben aferencias gustativas de forma directa o indirecta tales como el NAcb (Grau-Perales et al., 2019a), hipotálamo, corteza orbitofrontal (E. T. Rolls et al., 1979; E. T. Rolls, 2000; E. T. Rolls, 2004) PrH (Albasser et al., 2011; Gómez-Chacón et al., 2015; Morillas et al., 2017; Ramos, 2015) y corteza prefrontal medial (mPFC por sus siglas en inglés) (Caynas-Rojas et al., 2019; Dela Cruz et al., 2016), como áreas que participan en esta memoria.

Entre estas áreas el papel de la mPFC no ha sido suficientemente investigado, existiendo poca información sobre su contribución a la memoria de reconocimiento de sabores seguros a pesar de que si ha sido implicada en CTA (Akirav et al., 2006; González et al., 2015) y la memoria de reconocimiento de objetos (Akirav & Maroun, 2006).

3.3. Organización anatómica y funcional de la corteza prefrontal medial

El uso de diversas técnicas como la estereología, imagen por tensor de difusión (DTI, por sus siglas en inglés) y resonancia magnética tanto estructural (MRI por sus siglas en inglés) como funcional (fMRI por

sus siglas en inglés) entre otras, han permitido elaborar un mapeado neuroanatómico y funcional del cerebro de distintas especies. Combinando estas técnicas con modelos comportamentales se ha podido investigar la estructura y función de distintas cortezas cerebrales, entre ellas, la mPFC.

La mPFC se encuentra en la porción medial de la corteza prefrontal, situada en el lóbulo frontal, comparte conexiones con el resto de la neocorteza, el sistema límbico, Th y caudado/putamen, estructuras relevantes relacionadas con las denominadas funciones ejecutivas. Definir las funciones ejecutivas es una tarea complicada por tratarse de un término muy amplio. Se han propuesto diferentes marcos conceptuales para definir este término. El más empleado lo define como un conjunto de procesos cognitivos que comparten una base neuroanatómica común en la PFC pero que son empleadas de forma independiente según las demandas cognitivas o ambientales y por tanto merecen ser consideradas como independientes (Robbins et al., 1996). Estas funciones ejecutivas están involucradas en procesos de atención, inhibición, planificación, control, flexibilidad cognitiva y memoria de trabajo, siendo esta última, junto a la flexibilidad cognitiva, la que parece ser más sensibles al deterioro relacionado con el envejecimiento. Dado que son habitualmente definidas como funciones cognitivas de “alto

nivel” y que la PFC de primates es significativamente más compleja que la de roedores, son habitualmente caracterizadas como únicas de estos mamíferos. Sin embargo existe evidencia que indica que los roedores poseen homólogos neuroanatómicos y funcionales a los primates y que son capaces de realizar conductas dirigidas a un objetivo (Kesner & Churchwell, 2011). Por ello, el uso de modelos animales, especialmente de roedores, ofrece sistemas simplificados para el estudio de las complejas bases neurobiológicas de dichos procesos. Así, una aproximación neuroanatómica comparada, asociada a la controversia en torno a la existencia de mecanismos compartidos entre la PFC humana y la de cerebros de otras especies de mamíferos, principalmente las de animales usados en investigación como son los grandes simios y roedores, ha adquirido especial relevancia.

El incremento en el volumen cortical en primates es paralelo a una diferenciación evolutiva de áreas corticales y el desarrollo de funciones cognitivas más complejas. Este sería el caso de la región prefrontal dorsolateral (Uylings et al., 2003). Es cierto que la PFC de la rata no está tan diferenciada como la de primates y humanos pero la identificación de subregiones análogas entre la PFC de roedores y humanos no sólo se debe basar en análogos neuroanatómicos, sino también funcionales. Así, diferentes estudios han propuesto la equivalencia entre las diferentes

subregiones de la PFC de la rata y humano (Kesner & Churchwell, 2011; Öngür & Price, 2000; Paxinos & Watson, 1982).

En el cerebro de la rata la PFC se divide en corteza prefrontal lateral (LPFC por sus siglas en inglés) y medial (mPFC por sus siglas en inglés). LPFC se subdivide en corteza dorsal y ventral agranular (AI) y corteza lateral orbital (VLO por sus siglas en inglés) que abarcan el área 13 (AI) y 14 (LO) de Brodmann. Su zona más ventral (vPFC por sus siglas en inglés) está subdividida en corteza ventral orbital (VO) y ventrolateral orbital (VLO) cuyo análogo en el cerebro humano son el área 11 de Brodmann. A su vez mPFC puede subdividirse en una región dorsal y otra ventral. La región dorsal está compuesta por las cortezas precentral (PrCM por sus siglas en inglés) y cingulada anterior (ACC por sus siglas en inglés), cuyos homólogos en el cerebro humano son el área 6 (PrCM) y 24 (AC) de Brodmann. La región ventral está formada por la corteza prelímbica (PrL), corteza infralímbica (IL) que se corresponden en el cerebro humano con las áreas 32 (PrL) y 24 (IL) (Figura 4) (Akhter et al., 2014; Paxinos & Watson, 1982; Roet et al., 2019; Smith et al., 2019). En estudios iniciales sobre esta subregión de la PFC no se identificó la corteza peduncular dorsal (DP por sus siglas en inglés) como estructura independiente, sino que fue delineada como área ventral de la IL. Más adelante, mediante técnicas de trazado retrógrado (Gabbott et al., 2005)

y anterógrado (Fisk & Wyss, 2000) se identificaron conexiones entre la DP y el núcleo medio dorsal del tálamo, que, a su vez, comparte conexiones con IL.

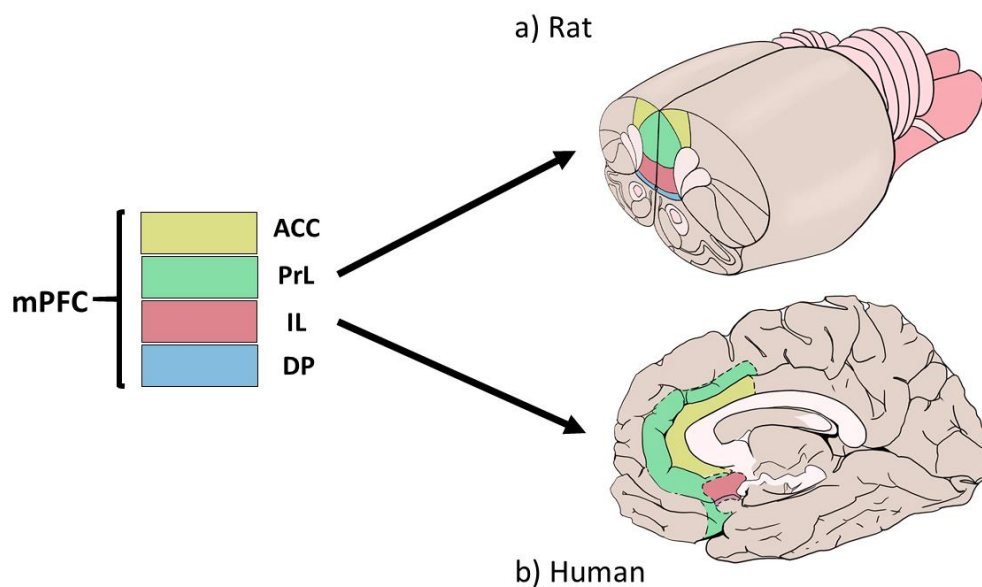


Figura 4.- Áreas homólogas en el cerebro de la rata y el ser humano de las distintas subregiones que conforman la corteza prefrontal medial.

Ello permitió identificarla como parte de la mPFC además de encontrarse conexiones con el subnúcleo caudal trigeminal, no compartidas con IL (Akhter et al., 2014) que la establecen como área diferenciada de esta. Sin embargo, su homólogo en el cerebro humano no ha sido estudiado en detalle.

En cuanto a la citoarquitectura, la PFC de la rata es una corteza agranular (AI). Esta misma AI es encontrada en simios y humanos que además poseen capas granulares (Wise, 2008).

Para discutir sobre la función de la PFC no solo basta con conocer su organización anatómica debido a que ninguna región de nuestro cerebro opera de forma aislada. Esto implica necesariamente tener en cuenta el papel de otras regiones cerebrales con las que comparte interconexiones. Las conexiones de la PFC incluyen los ganglios basales, Th, cerebelo, HC, AMY y otras regiones neocorticales (Ghashghaei & Barbas, 2002). La PFC recibe inputs de los ganglios basales por la vía estriatopalidal y nigroestriada y consecuentemente de proyecciones palidotálámicas y nigrotálámicas que proyectan de forma paralela a distintas áreas de la PFC. Además de estas conexiones cortico-tálámicas la PFC recibe inputs cortico-corticales desde la corteza parietal posterior y áreas sensoriales corticales. Concretamente, la PFC está conectada con las cortezas occipital, temporal y parietal. En consecuencia, integra información visual, auditiva y somatosensorial (Miller & Cohen, 2001). También recibe inputs desde estructuras subcorticales como es la sustancia negra, el área tegmental ventral y AMY (Kolb, 1990). La PFC no sólo recibe aferencias de estas áreas, sino que, de forma recíproca, envía proyecciones eferentes a todas estas áreas al igual que proyecta directamente al septum lateral, mesencéfalo y cerebelo (Kolb, 1990).

Las conexiones que se establecen entre las subdivisiones de la PFC y otras áreas cerebrales se pueden resumir de manera que la región

dorsal medial y la IPFC comparte importantes conexiones con la neocorteza, la corteza prefrontal ventromedial comparte conexiones con el sistema límbico (Heidbreder & Groenewegen, 2003; Kesner & Churchwell, 2011).

En el aspecto funcional las diversas subdivisiones de la PFC de la rata parecen estar implicadas en funciones cognitivas paralelas a las de sus homólogas en simios y humanos. Así, las investigaciones llevadas a cabo sugieren que ACC/PrCM juegan un papel en la memoria de trabajo y toma de decisiones, PrL/IL participan en la memoria de trabajo para objetos y lugares, asociaciones lugar/objeto y toma de decisiones, AI/LO apoyan la memoria de trabajo de olores, asociaciones olor-sabor y toma de decisiones, mientras que VLO/VO participan en el aprendizaje inverso y toma de decisiones (Kesner & Churchwell, 2011).

Sin embargo, estudios más recientes también han relacionado la mPFC con la memoria de sabores seguros. Se ha demostrado que lesiones con 6-OHDA de los terminales dopaminérgicos de la mPFC reduce la respuesta del NAcb a una solución familiar palatable de chocolate, manteniéndose la respuesta dopaminérgica a la novedad del sabor (Bimpisidis et al., 2013) aunque no existe más investigación que relacione la mPFC en éste tipo de memoria. Sin embargo, sí que ha sido relacionada con otras tareas como son la memoria de sabores aversivos la adquisición

de CTA, el aprendizaje de preferencia de sabores y el proceso de extinción de CTA (Akirav et al., 2006; González et al., 2015; Malkusz et al., 2012; Maroun et al., 2012; Mickley et al., 2007; Shehadi & Maroun, 2013; Touzani et al., 2010; Uematsu et al., 2015). Apoyando el papel de la mPFC en CTA se ha demostrado, mediante inmunohistoquímica de c-Fos, que la extinción de una aversión condicionada a sacarina incrementa la expresión de neuronas activadas c-Fos en mPFC frente a un grupo control que mantiene la asociación EC-LiCl (Mickley et al., 2005). En conjunto, con estos datos, la mPFC podría jugar un papel en la memoria de reconocimiento de sabores.

4. Envejecimiento y neofobia gustativa

4.1. Efecto del envejecimiento sobre la respuesta neofóbica en el ser humanos

El envejecimiento patológico, marcado por trastornos neurodegenerativos, suele estar asociado a déficits de memoria y aprendizaje. De hecho, uno de los marcadores tempranos de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson es la dificultad en el reconocimiento e identificación de los olores, dificultad que precede al deterioro de otras modalidades sensoriales de la memoria de reconocimiento (Aliani et al., 2013). El deterioro de la memoria de reconocimiento olfativa puede

alterar dramáticamente comportamientos de ingesta de alimentos y regulación de la dieta y en consecuencia interferir con la calidad de vida durante esta etapa marcada por otros importantes déficits. El estudio de las características comportamentales y fisiológicas del envejecimiento patológico representa un gran apoyo a la capacidad de los profesionales médicos a la hora de detectar estas alteraciones y llevar a cabo un mejor tratamiento de enfermedades con un desarrollo insidioso y prolongado en el tiempo.

También en ausencia de patologías puede existir un decaimiento funcional en tareas de aprendizaje y memoria asociado a la edad. Sin embargo, no se trata de un decaimiento global de la memoria, sino que parecen deteriorarse selectivamente algunas funciones mientras otras permanecen relativamente intactas o incluso incrementadas. De este modo memorias no dependientes de HC se mantienen o mejoran durante el envejecimiento mientras que tareas propias de la memoria declarativa dependiente del HC puede sufrir deterioro.

Con respecto a la respuesta de neofobia al sabor, durante un envejecimiento normal no patológico se mantienen bien preservadas las funciones relacionadas con la detección del sabor. A pesar de la existencia de cambios asociados al envejecimiento en la sensibilidad al sabor se ha demostrado en animales de laboratorio que no parecen ser suficientes

para afectar a su detección (Gámiz & Gallo, 2011). Durante la adultez, existe la oportunidad de acumular experiencias con un amplio rango de alimentos, lo que, presumiblemente, induce AN y/o aprendizaje de sabores. Por ello, es de esperar que la neofobia al sabor se reduzca a lo largo de la vida adulta y el envejecimiento gracias a la familiarización con estos variados sabores. Ello podría dar lugar a una generalización a sabores no familiares o, por el contrario, si estas experiencias con sabores han sido reducidas es de esperar que la respuesta neofóbica se mantenga durante el envejecimiento normal, tal como ocurre en los animales de laboratorio generalmente. Así, la magnitud de la neofobia al sabor durante el envejecimiento no patológico dependería de la variedad de la dieta y la variedad de sabores que se ha probado a lo largo de los años. Por ellos, las diferencias individuales inducidas por la experiencia previa modificarían la respuesta neofóbica al sabor en estados más avanzados de la vida (Gallo, 2018). Diferentes estudios con humanos encuentran resultados conflictivos que concuerdan con lo expuesto, dónde unos si encuentran un incremento (Henriques et al., 2009) y otros encuentran decremento (Pliner & Hobden, 1992) en la neofobia al sabor a edades avanzadas.

La importancia que adquiere la experiencia previa con sabores sobre la respuesta neofóbica en el envejecimiento recae en la forma que

esto afecta la dieta. La determinación de las preferencias individuales de unos sabores frente a otros afecta de forma crítica a la elección de alimentos. Esto ocurre en dos direcciones, una dirección implica que condiciones patológicas podrían afectar a las preferencias de sabores modificando la dieta del paciente. Por otro lado, la elección de alimentos, influenciada por las preferencias de sabores, es crucial para una dieta variada. En caso contrario, una dieta poco variada implica una mayor vulnerabilidad a desarrollar condiciones patológicas. Además, aunque la detección de sabores parece mantenerse intacto durante el envejecimiento sano, no habría que descartar déficits de memoria que podrían afectar al reconocimiento de sabores. Un envejecimiento normal puede implicar problemas de memoria, como se ha comentado antes, que afectarían selectivamente a las memorias dependientes del sistema hipocampal y las áreas corticales relacionadas (Gallo, 2018). Es esperable entonces que el reconocimiento de sabores se vea sujeto a un decaimiento durante el envejecimiento, incrementando la respuesta neofóbica por las dificultades de identificar estímulos familiares como se ha encontrado en modelos animales (Gómez-Chacón et al., 2015).

4.2. Efecto de la edad sobre la respuesta neofóbica en modelos animales

Está bien demostrado que los animales, al igual que los humanos, muestran alteraciones al ejecutar tareas de memoria y aprendizaje espacial en estadios más avanzados de la vida. Es por ello que el uso de roedores ha sido intensivamente utilizado como modelo de envejecimiento cognitivo. Así, ratas envejecidas, entre los 22 y 24 meses de edad, muestran déficits en tareas tales como laberinto en T, laberinto acuático de Morris y laberinto de Barnes (Mota et al., 2019). Gran parte de la investigación sobre la memoria de reconocimiento se ha centrado en su modalidad visual, mostrando déficits a partir de 24 horas de retención de la información, incluso con intervalos de retención más cortos cuando se utilizan objetos complejos (Gámiz & Gallo, 2012).

Sin embargo, cuando se trata de memoria de reconocimiento de sabores las ratas envejecidas adquieren aversiones gustativas condicionadas con más facilidad y más intensas que las ratas adultas. Así, se ha encontrado que adquieren aversiones más intensas y resistentes a la extinción empleando dilaciones entre la presentación del EC y el EI más largas de las soportadas en adultos (Gámiz & Gallo, 2011). Una posible interpretación es que la experiencia previa con sabores novedosos permita que la respuesta neofóbica en ratas envejecidas se pueda ver

incrementada, siendo estas más sensibles a la novedad que las adultas tras haber tenido una mayor experiencia con aversiones condicionadas previas a otros sabores (Morón & Gallo, 2007). Por otro lado, la respuesta neofóbica a sabores desconocidos también parece permanecer preservada en ratas envejecidas (Gámiz & Gallo, 2011), aunque el proceso de atenuación de la neofobia se ve enlentecido, requiriendo más exposiciones al sabor que las adultas para atenuar dicha respuesta neofóbica inicial (Gómez-Chacón et al., 2015).

4.3. Cambios cerebrales asociados a la edad

Las alteraciones comportamentales descritas a edades avanzadas están asociadas a alteraciones cerebrales morfológicas y funcionales. En este sentido, se ha demostrado que la pérdida de volumen cerebral en humanos (Driscoll et al., 2009) y ratas (Rapp et al., 1999) llega acompañada de decaimiento cognitivo. Cuando se producen estos déficits, se observa pérdida de volumen y atrofia dendrítica selectivamente en estructuras importantes para la memoria tales como el HC y la mPFC (Dickstein et al., 2013) afectando a la organización funcional y conectividad de los sistemas de memoria. Asimismo, el retraso asociado a la edad en la atenuación de la neofobia ha sido asociado a patrones alterados de la actividad de la PrH (Gómez-Chacón et al., 2015), corteza piriforme (Grau-Perales et al., 2019b) y NAcb (Grau-

Perales et al., 2019a) usando la expresión de c-Fos como índice de actividad neuronal. Mientras las ratas envejecidas muestran más actividad que ratas adultas en PrH (Gómez-Chacón et al., 2015) y NAcB Sh (Grau-Perales et al., 2019a) tras la sexta exposición a una solución de vinagre, cuando ya es familiar, en la corteza piriforme se encontró un incremento general de su actividad no relacionado con la familiaridad (Grau-Perales et al., 2019b).

Con respecto a la mPFC se ha demostrado que en distintas especies esta corteza es especialmente vulnerable a los efectos de la edad (de Brabander et al., 1998; Juraska & Lowry, 2012). En el cerebro humano, la actividad neuronal asociada a la memoria se encuentra incrementada en la región dorsal de la mPFC en adultos mientras que en ancianos se encuentra más incrementada en la región ventral de la mPFC (Cassidy et al., 2014). También en simios se ha demostrado que los déficits relacionados con la edad en la ejecución de una tarea DNMS son predichos por la densidad sináptica y la media del tamaño de las espinas sinápticas de la PFC (Dumitriu et al., 2010). De igual manera, en roedores se ha encontrado que los déficits en la fase de extinción en un paradigma de miedo condicionado corresponden a una dramática

reorganización de la excitabilidad de la mPFC (Kaczorowski et al., 2012).

En conjunto, la evidencia sugiere que la memoria de reconocimiento de sabores funciona de manera distinta a lo largo de la vida. Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos neuronales subyacentes implicados en esta memoria en ratas envejecidas y qué cambios estructurales se producen en las distintas áreas implicadas. Siendo la mPFC una de las áreas más afectadas por el envejecimiento es interesante prestar especial atención a la relación entre estas modificaciones funcionales a lo largo de la vida y la ejecución en tareas de memoria de reconocimiento de sabores.

5. Adolescencia y neofobia gustativa

Aunque la adolescencia en humanos se ve influenciada por circunstancias especiales debido a factores culturales, como los valores sociales y las condiciones económicas, entre otros aspectos, identificar las concomitancias de este período del desarrollo entre humanos y otros mamíferos es crucial para desarrollar la investigación en este campo. Estas semejanzas en términos de la repertorio comportamental y

características neuronales y hormonales aportan suficiente validez al desarrollo de modelos animales que emplean roedores como herramienta de estudio de la adolescencia. Para poder utilizar dichos modelos animales es necesario, previamente, entender cuál es la ventana de edad en la que este período ocurre en comparación con humanos. Mientras que en humanos se considera que la adolescencia se extiende desde los 12 a los 18 años, en ratas se ha establecido un rango que ocupa desde el día postnatal (PND) 28 al 42 (PND28-42) (Spear, 2000). Éste rango se ha establecido utilizando como criterio la discontinuidades conductuales entre animales más jóvenes y adultos, aunque también se apoya en otras medidas tales como la apertura vaginal (Döhler & Wuttke, 1975) o el aumento del número de espermatozoides (Clermont & Perey, 1957). Una vez establecida esta correspondencia entre humanos y la rata, la investigación sobre adolescencia ha procurado un gran volumen de estudios comportamentales sobre las características únicas de esta etapa del desarrollo madurativo.

5.1. Búsqueda de la novedad y conductas de riesgo

Tanto en humanos, como en otras especies, durante el período de la adolescencia se muestran comportamientos peculiares como el incremento de interacciones sociales con los iguales, aumento de conductas de búsqueda de la novedad y conductas de riesgo. Estos rasgos

parecen ser resultado de mecanismos evolutivos de supervivencia que ayudan a los adolescentes a abandonar la dependencia infantil y alcanzar la independencia propia de la vida adulta.

En humanos, las interacciones sociales y las afiliaciones con compañeros de edades parecidas son especialmente relevantes durante la adolescencia, proporcionando una fuente de experiencias positivas que ayudan a desarrollar habilidades que facilitan alcanzar la independencia del núcleo familiar. Parece ser que las interacciones sociales en esta etapa ayudan también a guiar la elección de alimentos, reduciendo el tiempo dedicado a localizar nutrientes necesarios y reducir la probabilidad de ingesta de alimentos tóxicos (Galef, 1977).

Respecto a las conductas de riesgo y la búsqueda de la novedad, en comparación con otras edades, los adolescentes humanos muestran una mayor búsqueda de sensaciones y toma de riesgos, conductas con resultados potencialmente peligrosos para el propio individuo como el consumo de drogas o accidentes. Aun así, las conductas de riesgo permiten alcanzar un arousal positivo provocado por experiencias novedosas, complejas e intensas como ocurre con la ingesta de drogas (Spear, 2000) que también tienen un valor adaptativo.

En otras especies también existen comportamientos de búsqueda de aspectos ambientales novedosos y arriesgados. Por ejemplo, ratas

dentro del período adolescente muestran una mayor exploración de situaciones novedosas que ratas de otras edades (Douglas et al., 2003; Spear et al., 1980). Ante estímulos novedosos presentados en un ambiente familiar las ratas adolescentes muestran una mayor actividad locomotora inducida por la novedad, mayor preferencia por la novedad y más conductas exploratorias en comparación con adultos (Stansfield & Kirstein, 2006). Del mismo modo, los ratones también muestran mayor exploración de los brazos descubiertos del laberinto en cruz (Macrì et al., 2002) y otros estudios encuentran una fuerte correlación entre la preferencia por la novedad y la impulsividad con la autoadministración de estimulantes psicomotores y su eficacia reforzante (Klebaur et al., 2001).

En contrapartida, los adolescentes parecen tener una respuesta emocional más intensa que los adultos a las propiedades estresantes de un ambiente novedoso. Así, las ratas evitan en mayor medida la zona central potencialmente peligrosa durante la exploración de un campo abierto (Lynn & Brown, 2010) o incrementan la velocidad al cruzarla en comparación con adultas (Lundberg et al., 2019). La peculiar combinación de búsqueda de novedad y mayor reactividad ante sus connotaciones estresantes es propia únicamente de esta etapa de la vida y tiene un gran valor adaptativo ya que favorece la supervivencia durante

la exposición a situaciones de riesgo asociadas a la búsqueda de novedad que es necesaria para alcanzar la independencia adulta. En conjunto, las conductas de riesgo y la búsqueda de novedad permiten a los adolescentes explorar lugares desconocidos, nuevos congéneres para el apareamiento y nuevos alimentos sin depender del cuidado parental, creando así una representación más amplia del mundo y permitiendo aprender nuevas estrategias para su supervivencia en un ambiente cambiante que les permita convertirse en adultos independientes.

5.2. Maduración cerebral durante la adolescencia

Durante la adolescencia se producen cambios críticos en los circuitos cerebrales que controlan funciones emocionales, cognitivas y sociales. Con respecto a las alteraciones propias de la adolescencia en las respuestas ante la novedad son de destacar las modificaciones que sufren los circuitos de recompensa que involucran proyecciones córtico-límbicas, estriado ventral, AMY, NAcb y PFC, además de la inervación dopaminérgica de estas estructuras.

Tanto el NAcc, la AMY y la PFC se encuentran integrados en el circuito mesolímbico relacionado con la motivación y la recompensa. En este circuito el NAcc juega un papel esencial en los procesos de recompensa implicados en motivar a los animales a escoger el curso de

acciones más ventajoso para conseguir un resultado óptimo. La AMY, en cambio, codifica el valor afectivo de los estímulos y envía esta información a diferentes sistemas, incluido el NAcc, pero también al tronco cerebral y los sistemas de respuesta implicados en evitar o alejarse de situaciones negativas (LeDoux, 2000). Esta visión puede ser simplista ya que actualmente se conoce que la AMY (Bechara et al., 2003) junto con el NAcb (Grau-Perales, Gómez-Chacón, & Gallo, 2019; Schoenbaum & Setlow, 2003) participan en aprendizajes apetitivos. En todo caso, el papel que juegan el NAcc y la AMY en el uso de representaciones sobre el valor emocional o utilidad de los reforzadores es útil para guiar las respuestas conductuales a los estímulos. Así, los cambios en el procesamiento de los resultados pueden afectar directamente al comportamiento de evitación y contribuir a la toma de conductas de riesgo en los adolescentes (Oliva, 2007). De ahí se ha interpretado que la sobreexcitación del circuito mesocorticolímbico dopaminérgico impulsa a los adolescentes a la búsqueda de la novedad y el riesgo. Por ejemplo, mediante resonancia magnética, se ha encontrado una mayor actividad del NAcc en adolescentes humanos que en personas de otras edades en una tarea de respuesta demorada con dos opciones (Galvan et al., 2006). El sistema de evitación, por su lado, se muestra menos sensible a las consecuencias negativas de la conducta ya que la AMY experimenta

cambios durante la adolescencia que consisten en una menor actividad bajo condiciones estresantes (Kellogg, 1998).

Especial relevancia cobra la PFC, una de las áreas que debido a su interacción con otras estructuras, juega un papel principal en la atención, la toma de decisiones, la regulación emocional e inhibición de conductas, funciones críticas para las conductas de riesgo/recompensa (Kang et al., 2018; Kelley, 2004; Selleck et al., 2018; Spear, 2000).

La evidencia indica que esta corteza está sujeta a cambios importantes durante la adolescencia. En cerebros humanos se ha demostrado que es de las últimas regiones en las que se produce la mielinización de sus neuronas y la poda sináptica, lo que reduce la densidad sináptica y el volumen de sustancia gris para facilitar la actividad prefrontal madura propia del adulto (Giedd, 2004). En ratas, el período de la adolescencia está marcado por un fuerte incremento en la conexión entre la AMY y la PFC, que se corresponde con la maduración del control emocional y los procesos implicados en la toma de decisiones.

Así, los diferentes ritmos de maduración y desequilibrios del SN durante la adolescencia podrían explicar su comportamiento característico y singular.

5.3. Adolescencia y memoria de reconocimiento visual.

En cuanto a la memoria de reconocimiento, parece ser que en la modalidad visual las ratas adolescentes realizan la tarea de NOR con el mismo rendimiento que ratas adultas. Múltiples estudios han usado la tarea de NOR como parte de una batería de pruebas comportamentales en ratas adolescentes. Los resultados han demostrado peor ejecución en ratas adolescentes con déficits neurocognitivos debidos a deficiencias de hierro en el período perinatal (Wu et al., 2008) o por alteraciones del ritmo circadiano (Toki et al., 2007). Sin embargo Reger et al. (2009) han demostrado que la ejecución de esta tarea en ratas adolescentes sanas es similar a la de ratas adultas. Mientras ratas preadolescentes recién destetadas (PND20-23) pueden reconocer el objeto novedoso cuando el tiempo de retención entre la adquisición y la prueba de memoria era breve (15 min y 1h), pero empeoran su ejecución si se aumenta la demoras (24h y 48h). Sin embargo, la ejecución de ratas adolescentes (PND29-40) no difiere de las adultas (PND+50) en períodos de retención de 24 horas. Ninguno de los grupos de edad reconoce el objeto familiar tras 48 horas de retención (Reger et al., 2009).

Los autores proponen que esta mejora en la ejecución de las ratas adolescentes y adultas frente a las recién destetadas parece coincidir con el fin de la neurogénesis y sinaptogénesis producida en el giro dentado del complejo hipocampal. Otra de las interpretaciones que aportan se

basa en el avanzado estado de maduración de la PrH durante la preadolescencia, lo que soportaría la memoria del objeto durante intervalos de retención cortos (Reger et al., 2009). El distinto curso de maduración durante la adolescencia tanto de la PFC como sus conexiones con otras áreas relacionadas con la memoria de reconocimiento podría explicar estos déficits de retención.

5.4. Adolescencia y memoria de reconocimiento de sabores.

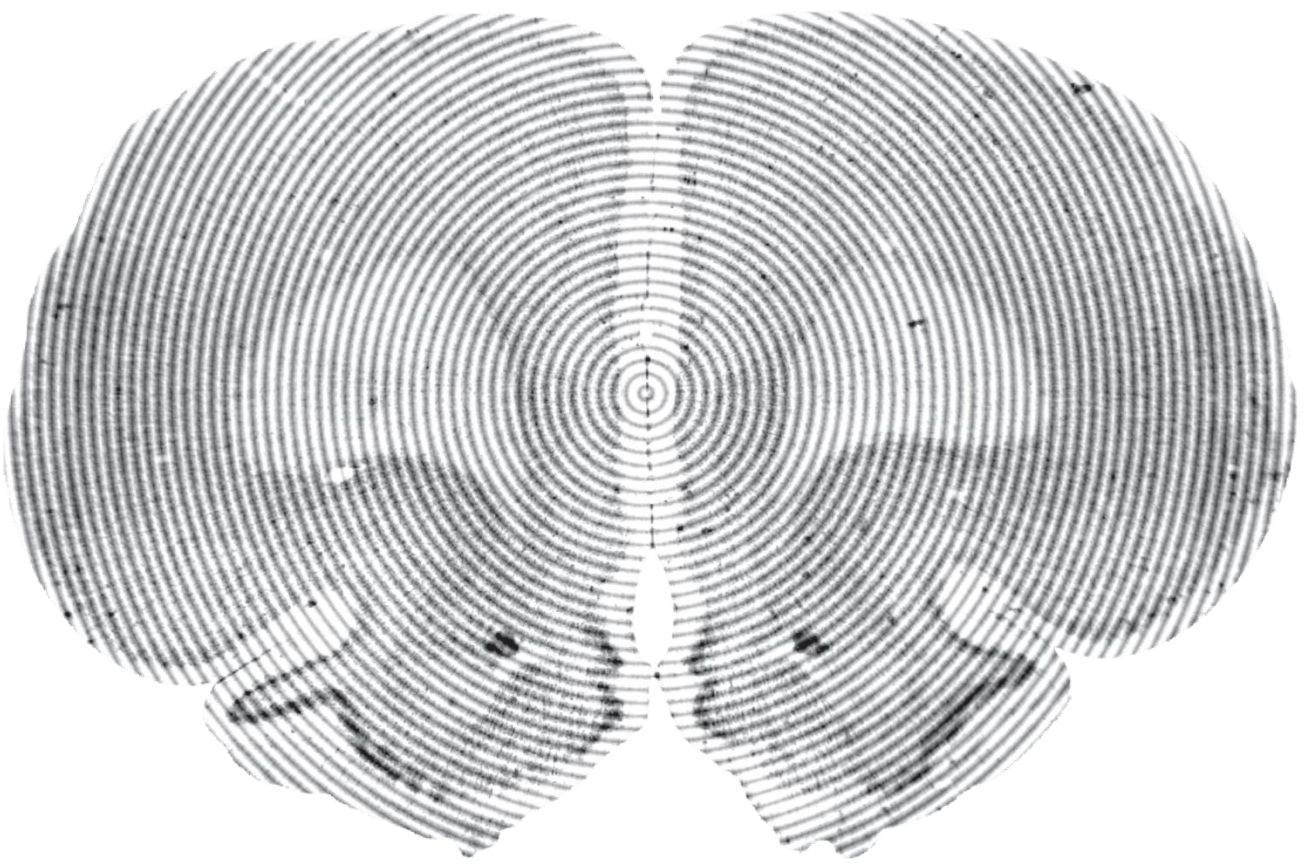
Con respecto a la memoria de reconocimiento en su modalidad gustativa, la investigación sobre su desarrollo durante la adolescencia es escasa. Estudios previos que han registrado una respuesta neofóbica reducida en ratas adolescentes (Darmani et al., 1996; Spear, 2000) que se ha asociado al incremento en la búsqueda de la novedad propio de la adolescencia. Por otra parte, resultados de otras investigaciones han mostrado que la habilidad de adquirir aversiones a concentraciones bajas de cloruro sódico ocurren ya desde el PND32 (Manrique et al., 2009). Esto coincide con experimentos previos en los que se produjo aversión a soluciones saladas inducida por LiCl a edades tempranas (Kehoe & Blass, 1986). A pesar de la poca información existente, sí que se conoce que durante la adolescencia se incrementa la ingesta de comida, lo que se ha asociado al rápido crecimiento durante este período. Este consumo exacerbado es particularmente evidente con sabores palatables, ya que,

en comparación con ratas adultas, las adolescentes consumen más soluciones dulces con propiedades calóricas como leche condensada (Friemel et al., 2010). Asimismo, las ratas adolescentes consumen en mayor medida que las ratas adultas una solución de sacarosa (1%) en comparación con el consumo de agua en un test de elección durante 14 días (Wilmouth & Spear, 2009). Probablemente, esta preferencia por sabores altamente palatables como el dulce se muestre exacerbado por la necesidad de nutrientes para un sano crecimiento en esta etapa. Sin embargo, no existen estudios que exploren el consumo de adolescentes de sabores que no estén acompañados de propiedades calóricas.

Teniendo en cuenta la reorganización cerebral que ocurre en esta etapa, asociada a las conductas de búsqueda de novedad y toma de riesgos, explorar la evolución de la respuesta de neofobia a un sabor sin propiedades calóricas y su atenuación en ausencia de consecuencias durante la adolescencia representa una oportunidad para estudiar la formación de la memoria de reconocimiento de sabores.

Capítulo 2

Justificación y objetivos



1. Justificación

La memoria de reconocimiento representa un subsistema de memoria encargado de reconocer como familiares estímulos percibidos previamente. El recuerdo de estímulos familiares incluye información sobre sus consecuencias lo que determina la respuesta comportamental ante ellos. El reconocimiento de estímulos familiares de diversas modalidades sensoriales se establece como mecanismo básico de supervivencia, permitiendo la adaptación del organismo a un medio en constante cambio. La supervivencia requiere tanto evitar estímulos o situaciones asociados previamente a consecuencias potencialmente perjudiciales como reconocer estímulos beneficiosos o seguros para el mantenimiento de la vida.

Es por ello que se han utilizado diversas tareas conductuales en el ámbito de la Psicobiología con el fin de estudiar el comportamiento asociado al reconocimiento de estímulos familiares y establecer los mecanismos cerebrales implicados. De especial relevancia es la AN que se basa en el reconocimiento de un sabor familiar como seguro ya que no ha sido seguido de consecuencias gastrointestinales aversivas en ocasiones anteriores. El proceso de AN conlleva un cambio en el valor hedónico del sabor que se convierte en seguro y agradable. Ello va asociado a

modificaciones en la actividad de diversas áreas cerebrales con funciones en distintas fases del proceso.

Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio mediante la técnica inmunohistoquímica de c-Fos han sugerido diversas áreas con un potencial papel en el proceso de AN. En la PrH Gómez-Chacón (2015) describe un aumento de las células c-Fos positivas durante la ingesta de un sabor novedoso. Por otra parte, tras repetidas presentaciones de un sabor se produce un incremento de la actividad neuronal en la región rostral de la pPirCx (Grau-Perales, Gómez-Chacón, Morillas, et al., 2019) y un aumento progresivo en la actividad del núcleo ventral posteromedial del tálamo (Morillas et al., 2014). Respecto al NAcb, se ha descrito un aumento de la actividad del NAcb Sh el segundo día de presentación del sabor durante la primera y sexta presentaciones (Grau-Perales, Gómez-Chacón, & Gallo, 2019). Siendo la AN un aprendizaje que necesita de ausencia de consecuencias negativas podría interpretarse esa ausencia como un reforzador, implicando un incremento en el valor hedónico del sabor mediante las repetidas exposiciones a éste. Por ello, no es de extrañar el incremento de la actividad de NAcb, pero no existen datos sobre las alteraciones de la actividad de otras áreas que forman parte crucial del circuito de recompensa.

Por ello, se hace necesario indagar en áreas interconectadas con NAcb como es el caso de la mPFC, que, además, parece ejercer un papel importante en tareas de memoria de reconocimiento tanto visuales (Akirav & Maroun, 2006) como gustativas durante la extinción de CTA (Mickley et al., 2005). Sus conexiones tanto con la IC gustativa, último relevo del sistema sensorial gustativo (Selleck et al., 2018), como con la AMY que regula la respuesta emocional a sabores (Uematsu et al., 2015) además de formar parte del circuito de recompensa, interaccionando con NAcb (Bimpisidis et al., 2013), abren la posibilidad de que la actividad de mPFC sufra modificaciones durante la familiarización con sabores asociada a la memoria de reconocimiento gustativa.

Resulta, además, interesante investigar los cambios asociados a la edad avanzada en la actividad de mPFC durante el proceso de familiarización gustativa ya que la memoria de reconocimiento resulta afectada a edades avanzadas y esta área se muestra especialmente vulnerable a los efectos del envejecimiento en diversas especies (de Brabander et al., 1998; Juraska & Lowry, 2012). El avance en los conocimientos sobre el efecto de la edad en los mecanismos cerebrales de la memoria de reconocimiento gustativa puede contribuir a la comprensión de los cambios estructurales y conductuales producidos por el envejecimiento y los procesos patológicos asociados a la edad. Se ha

establecido que el decaimiento asociado al envejecimiento no ocurre de manera unitaria en todos los sistemas de memoria, sino que puede implicar el deterioro selectivo de ciertas funciones a la vez que otras permanecen intactas e incluso potenciadas. En el caso de la memoria gustativa, parece conservarse de forma óptima, tanto en la respuesta a la novedad, que aparece potenciada (Gámiz & Gallo, 2011), como en la atenuación de la neofobia, que permanece preservada (Morón & Gallo, 1997), a diferencia de lo que ocurre en otras modalidades sensoriales como la olfativa. Por ello, explorar la actividad de mPFC en ratas envejecidas durante el consumo de un sabor nuevo y la AN representa una oportunidad única para identificar cambios plásticos asociados a la edad en ausencia de deficiencias comportamentales. Estudios previos de nuestro laboratorio han hallado alteraciones en ratas de edad avanzada en la actividad de distintas áreas implicadas en AN tales como PrH (Gómez-Chacón et al., 2015), corteza piriforme (Grau-Perales, Gómez-Chacón, Morillas, et al., 2019) o NAcb (Grau-Perales, Gómez-Chacón, Morillas, et al., 2019).

Por otra parte, en la actualidad existe poca investigación sobre AN durante el período de la adolescencia. Esta etapa es especialmente importante para la transición de la dependencia infantil del cuidado parental a la independencia adulta. Por ello, la adolescencia esta

especialmente caracterizada por búsqueda de la novedad asociada a conductas de riesgo, así como una mayor reactividad emocional ante la amenaza que representan los estímulos desconocidos. Está demostrado que los adolescentes exploran más que los adultos objetos novedosos neutros en tareas de ORM y recorren más distancia en tareas de open-field (Lundberg et al., 2019; Philpot & Wecker, 2008). Ello es congruente con la reducción de la respuesta neofóbica durante esta etapa del desarrollo. Sin embargo, la evidencia en relación con la memoria de sabores en esta etapa es escasa. Únicamente se ha descrito que los adolescentes muestran un mayor consumo de soluciones calóricas como leche condensada (Friemel et al., 2010) y otras soluciones azucaradas (Wilmouth & Spear, 2009). Ello puede deberse tanto a la reducción de la respuesta neofóbica como a la necesidad de incrementar el consumo de calorías para soportar el crecimiento acelerado propio de esta edad, o bien a una mayor reactividad emocional ante las propiedades apetitivas de reforzantes naturales, como el sabor dulce. Dado que no existen datos previos sobre la respuesta neofóbica producida por otros sabores ni sobre AN, adquiere especial importancia investigar la respuesta neofóbica que los adolescentes exhiben ante soluciones gustativas que no posean componentes nutritivos ni sean palatables, así como su atenuación.

2. Objetivos e hipótesis

Por lo tanto, para indagar en los cambios conductuales y cerebrales que se producen a lo largo de las diversas etapas de la vida, esta Tesis Doctoral se plantea los siguientes objetivos e hipótesis asociadas:

- 1) Evaluar la actividad de la mPFC y sus subdivisiones (Cingulada anterior, Prelímbica, Infralímbica y Peduncular), mediante la determinación inmunohistoquímica de la proteína c-Fos durante la ingesta de una solución ácida de vinagre (3%) en cada una de 6 exposiciones al mismo sabor en ratas adultas. Nuestra hipótesis es que si el sabor es presentado en repetidas ocasiones entonces la actividad de la corteza prefrontal medial ventral se verá significativamente incrementada conforme el sabor se convierte en familiar.

(Capítulo 3).

- 2) Evaluar la actividad de la mPFC y sus subdivisiones mediante la aplicación de la inmunohistoquímica c-Fos durante la misma tarea de AN a una solución de vinagre (3%) en ratas envejecidas. Nuestra

hipótesis es que si se presenta repetidamente la solución de vinagre (3%), la actividad de las subregiones de esta estructura se encontrará reducida con respecto a la de ratas adultas, lo cual se puede relacionar con las alteraciones producidas en el proceso de AN en la vejez.

(Capítulo 3).

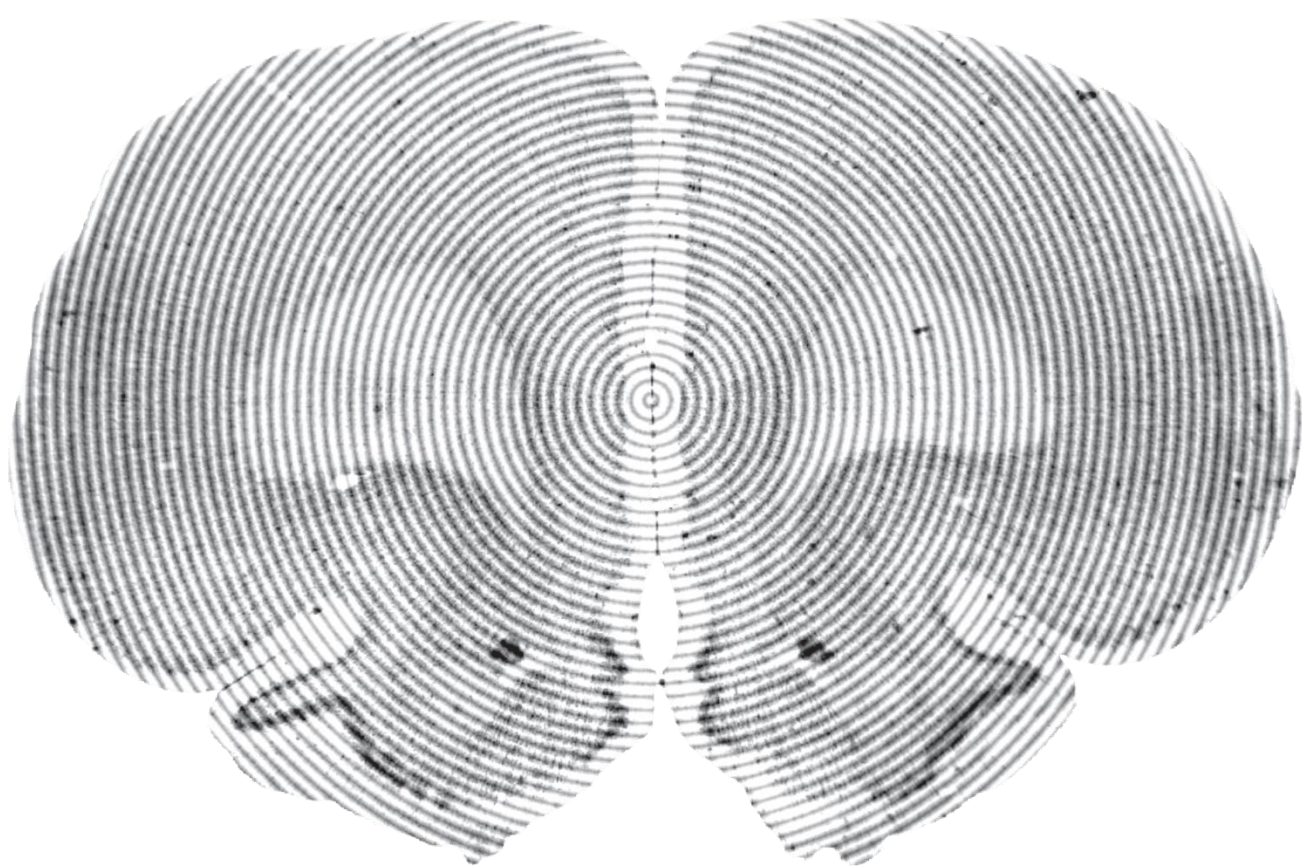
- 3) Investigar el patrón de conducta de ratas adolescentes ante una solución gustativa desconocida y durante las presentaciones posteriores a medida que se convierte en familiar. Para explorar el efecto de la palatabilidad sobre la respuesta neofóbica y la AN se propone emplear soluciones de vinagre (3%) y sacarina sódica (0,1%). Se hipotetiza una neofobia reducida con respecto a adultos, especialmente asociada a la solución dulce debido al incremento en la búsqueda de la novedad, lo cual se relaciona con la elevada necesidad de encontrar fuentes de nutrientes en entornos novedosos que permitan un crecimiento rápido y saludable.

(Capítulo 4).

Capítulo 3

PREFRONTAL CORTEX ACTIVITY PATTERNS DURING TASTE NEOPHOBIA HABITUATION IN ADULT AND AGED RATS

Este capítulo corresponde al artículo Expósito AN, Morillas E, Gómez-Chacón B, Gallo M (2020) Prefrontal cortex activity patterns during taste neophobia habituation in adult and aged rats. Behav Brain Res 392:112717. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112717>



1. Abstract

Age-related memory decline has been associated with changes in the medial prefrontal cortex (mPFC) function. In order to explore the role of mPFC in taste recognition memory, we have assessed mPFC c-Fos immunoreactivity in adult (5-month-old) and aged (24-month-old) male Wistar rats during the first (Novel), second (Familiar I), and sixth (Familiar II) exposure to a cider vinegar solution. Adult brains showed higher c-Fos expression in the ventral but not the dorsal region of mPFC during the second taste exposure. Interestingly, old brains exhibited an altered activity pattern selectively in the dorsal peduncular cortex (DP) which can be associated with a delayed attenuation of vinegar neophobia in this group. These results support the involvement of this area in the formation of safe taste memory. Further research is needed for understanding the role of DP in taste recognition memory and the impact of aging on it.

2. Introduction

Age-related cognitive decline is evident in a variety of memory impairments that involve the prefrontal cortex, a vulnerable brain region (Hamezah et al., 2017). Among them, recognition memory has been proposed as the purest measure of age-related memory deficit in humans (Fraundorf et al., 2019). The ability to recognize previously encountered stimuli as familiar can be studied in rodents through different sensory modalities. Aged mice (Belblidia et al., 2018) and rats (Hamezah et al., 2017; Melo et al., 2012) exhibit impairments in visual recognition memory tests. These impairments have been associated with altered brain activation in areas such as the perirhinal cortex and the hippocampus (Belblidia et al., 2018), as well as a reduced volume of the striatum, the hippocampus, and the medial prefrontal cortex (mPFC) (Hamezah et al., 2017). Meanwhile, taste recognition memory is relatively well preserved during aging. Taste neophobia which consists in the reduced intake of novel tastes is evident in aged rats (Gámiz & Gallo, 2011; Morón & Gallo, 2007). The attenuation of taste neophobia (AN) upon repeated taste exposures without consequences is delayed in aged rats (Gómez-Chacón et al., 2015; Pellemounter & Cullen, 1993). This age-related delay in AN has been associated with altered activity patterns in the perirhinal cortex (Gómez-Chacón et al., 2015), the piriform cortex

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats (Grau-Perales, Gómez-Chacon, Morillas, et al., 2019) and the nucleus accumbens (Grau-Perales, Gómez-Chacón, & Gallo, 2019) using c-Fos expression as an index of neural activity. While aged rats exhibit higher activity than adult rats in the perirhinal cortex (Gómez-Chacón et al., 2015) and the nucleus accumbens (Grau-Perales, Gómez-Chacón, & Gallo, 2019) shell during drinking a familiar vinegar solution after six exposures, an age-related overall increased activity in the piriform cortex not related to flavor familiarity has been reported (Grau-Perales, Gómez-Chacón, Morillas, et al., 2019).

Previous evidence has pointed out the interaction between the nucleus accumbens and mPFC during taste familiarization in adult rats. It has been shown that depletion of mPFC dopamine (DA) by 6-OHDA lesions prevented the reduced accumbens DA response to a familiar palatable chocolate taste solution thus maintaining the DA response to taste novelty (Bimpisidis et al., 2013). As far as we know, to date this was the only study suggesting the potential involvement of mPFC in taste familiarization. Nonetheless, there is plenty of evidence showing the implication of mPFC in other taste memory tasks such as conditioned taste aversion (CTA) (González et al., 2015; Mickley et al., 2007; Shehadi & Maroun, 2013; Uematsu et al., 2015) and flavor preference learning (Malkusz et al., 2012; Touzani et al., 2010). Furthermore, mPFC seems to

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats have a particular role in the extinction of learned responses including CTA (Akirav et al., 2006; Maroun et al., 2012; Shehadi & Maroun, 2013). In fact, this has been proven through immunohistochemical c-Fos determination, showing that extinction of a learned taste aversion is associated with increased mPFC activity (Mickley et al., 2005). Given that CTA extinction involves a shift of the taste's hedonic value from aversive to safe, it can be hypothesized a similar involvement of mPFC in the hedonic shift taken place during AN.

A plethora of studies in different species, including rodents, have reported that the prefrontal cortex is especially vulnerable to the effects of aging (Juraska & Lowry, 2012). Therefore, it seems valuable to extend our previous work on AN-related brain activity to the mPFC. The rat's mPFC is a heterogeneous brain region that can be subdivided into different subdomains according to a variety of criteria (Fig 1a). Based on cytoarchitectonic features, mPFC can be divided into anterior cingulate (ACC), prelimbic (PrL), infralimbic (IL), and dorsal peduncular (DP) cortices (Öngür & Price, 2000; Paxinos & Watson, 1982). According to anatomical criteria and connectivity with other brain areas, it has been suggested a subdivision into a dorsal component (dmPFC) that includes ACC and the dorsal region of PrL, versus a ventral component (vmPFC) that includes the ventral region of PrL, IL, and DP (Heidbreder &

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats (Groenewegen, 2003). This latter component seems to be involved in flexible shifting to new strategies in spatial learning (Heidbreder & Groenewegen, 2003), which is in accordance with the reported involvement of IL in CTA extinction (Maroun et al., 2012; Shehadi & Maroun, 2013).

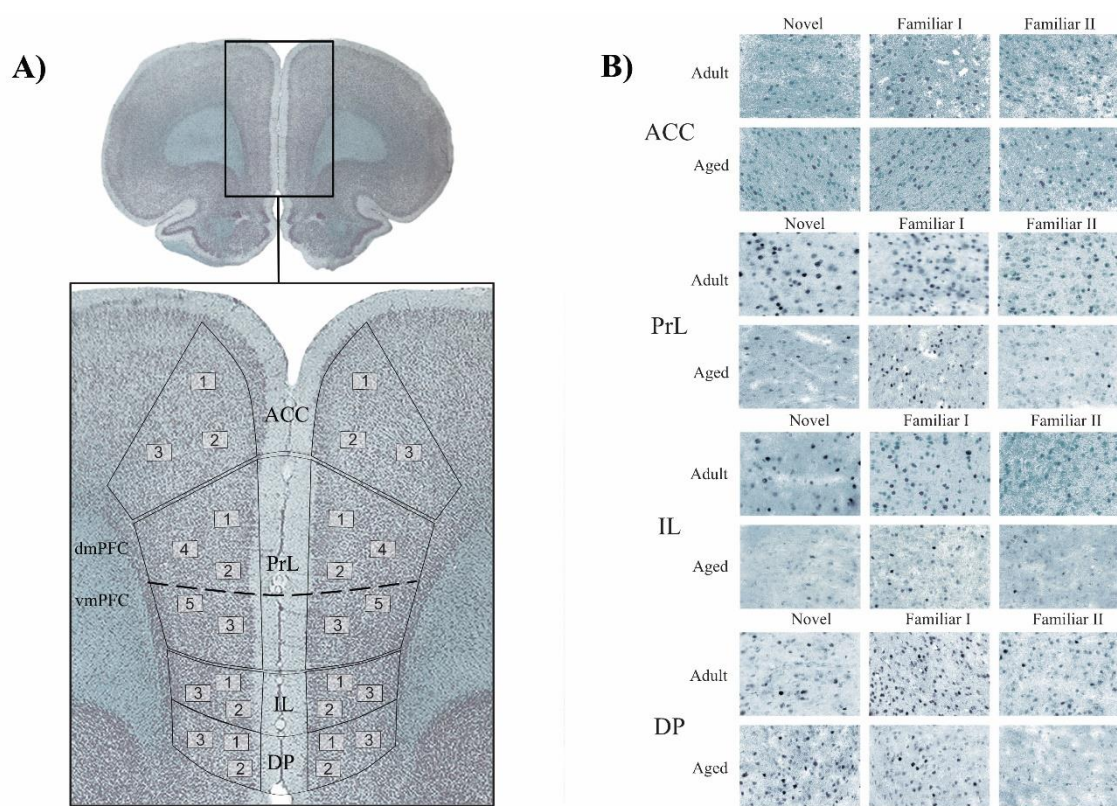


Figure 1. A) Location of the microphotographs (100 microns, 40X) covering the regions of the mPFC assessed. The images were numbered following a dorso-ventral and medio-lateral axis. **B)** Representative microphotographs showing c-Fos positive cells in the anterior cingulate cortex (ACC), prelimbic cortex (PrL), infralimbic cortex (IL) and dorsal peduncular cortex (DP) of adult and aged rats belonging to the three familiarity groups (Novel, Familiar I and Familiar II).

In order to explore the effects of aging on mPFC activity during taste neophobia and its attenuation, we assessed c-Fos protein expression as an index of neural activity in adult and aged rats during the first (Novel), the second (Familiar I), and the sixth (Familiar II) exposure to a vinegar solution. This technique has been extensively used for mapping the brain areas activated during the exposure to novel and familiar tastes because c-fos is an immediate early gene expressed transiently and rapidly when neurons are active thus reflecting recent activity more precisely than other markers of neural activity. We compared c-Fos expression using two different classifications for mPFC regions: a dorso-ventral division including the two components dmPFC and vmPFC; and a second more conventional division including ACC, PrL, IF, DP (Fig. 1a).

3. Method

3.1. Subjects and procedure

As it has been previously reported (A. Grau-Perales et al., 2019b), 21 adult (5-month-old) and 24 aged (24-month-old) male Wistar rats were housed individually and maintained on a 12 h light/dark cycle (light from 08:00 to 20:00h). Food was available ad libitum but they were subjected to a water deprivation schedule with two daily drinking

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats sessions (15 minutes during the morning and 20 minutes during the afternoon). After stabilizing the water drinking baseline, the animals had access to a non-palatable cider vinegar solution (3%) during the morning drinking sessions for six consecutive days. It has previously reported no differences in acid taste preferences between adult and aged rats (Inui-Yamamoto et al., 2017). Intake (ml) was recorded by weighing the drinking tubes before and after each drinking session. According to the experimental day in which they were euthanized to perform immunohistochemistry of the protein c-Fos, the rats were assigned to the following groups: adult ($n = 7$) and aged ($n = 8$) rats euthanized on day 1 (Novel group); adult ($n = 7$) and aged ($n = 8$) rats euthanized on day 2 (Familiar I); and adult ($n = 7$) and aged ($n = 8$) rats euthanized on day 6 (Familiar II). Euthanasia took place 90 minutes after the corresponding drinking session. The experimental procedure was approved by the University of Granada Ethics Committee for Animal Research and Junta de Andalucía (17-02-15-195).

3.2. c-Fos Immunohistochemistry

The immunohistochemical procedure has been described elsewhere (Gómez-Chacón et al., 2015; Grau-Perales, Gómez-Chacón, Morillas, et al., 2019; Grau-Perales, Gómez-Chacón, & Gallo, 2019). In brief, under deep anaesthesia the rats were transcardially perfused with

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats

0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde, the brains were removed and coronal sections approximately between +3.24 mm and +2.76 mm relative to bregma were cut at 20 μ m using a cryostat (Leica CM1900). Tissue sections were then rinsed in phosphate-buffered saline (PBS 0.01M, pH 7.4), incubated in 3% goat serum and 0.4% Triton X-100 in PBS for 30 min. The slices were transferred to a c-Fos primary antibody (Rabbit anti c-Fos antibody, 1:10,000; Sigma-Aldrich) for 48h at 4°C. They were incubated in a secondary antibody (Biotinylated goat anti-rabbit IgG, 1:500; Calbiochem) for 120 min at room temperature. Primary and secondary antibody solutions were mixed in a solution of 2% normal goat serum, 0.4% Triton X-100, and PBS. The sections were rinsed again and processed using the ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The reaction was visualized using the peroxidase substrate kit (DAB) (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Finally, they were rinsed, mounted on gelatine-subbed slides, rehydrated with ethanol and xylenes and finally they were cover-slipped.

3.3. Cell quantification

In order to quantify c-Fos positive cells, 14 digital images per hemisphere from two different sections were captured in each brain using a light microscope (Olympus BX41) at 40x magnification following a rostro-caudal division. As shown in Figure 1a, the total number of

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats

images taken in each subdivision and hemisphere was: ACC: 6, PrL: 10, IL: 6 and DP: 6. When considering the dorso-ventral division, this means that we took 12 images in dmPFC and 16 in vmPFC. The number of Fos-positive cells was counted automatically using the Image J software (National Institute of Mental Health). For each image's threshold objects having specific area (25-135) and circularity (0.25-1.00) values matching those of c-Fos positive nuclei were automatically counted by the software. Beforehand, in order to equalize all images and cancel out the background noise, they were converted into 8-bit type image and the background was lightened (50.0 pixels). Mean values were calculated for each brain area.

4. Results

The behavioural results corresponding to the Familiar II groups are available elsewhere (A. Grau-Perales et al., 2019b). In brief, both adult

Table 1.

Mean (\pm SEM) vinegar consumption (ml.) of the different adult and aged groups.

	Novel	Familiar I	Familiar II
Adult	6.32 (\pm 0.53)	9.64 (\pm 0.87)	11.73 (\pm 0.78)
Aged	5.65 (\pm 0.8)	7.01 (\pm 0.8)	11.51 (\pm 0.79)

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats and aged groups exhibited vinegar neophobia but the aged groups showed a delayed AN requiring one more vinegar exposure in order to reach the same amount of vinegar intake than that of Day 6. There were no differences between adult and aged groups in water intake during the baseline or in vinegar consumption during the drinking sessions prior to euthanasia: novel [$F(1, 13) = .36$; $p = .55$, $\eta^2 = .027$], familiar I [$F(1, 13) = .421$; $p = .06$, $\eta^2 = .245$] and familiar II [$F(1, 13) = .043$; $p = .83$, $\eta^2 = .003$]

(Table 1).

The mean (\pm SEM) number of c-Fos positive cells of both adult and aged rats under the three taste familiarity conditions (Novel, Familiar I, and Familiar II) is shown in Figure 2. Independent 2x3 bifactorial ANOVA (age x familiarity) analyses were performed for each area using two different classifications: dmPFC and vmPFC (Figure 2a); and ACC, PrL, IF, DP (Figure 2b).

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats

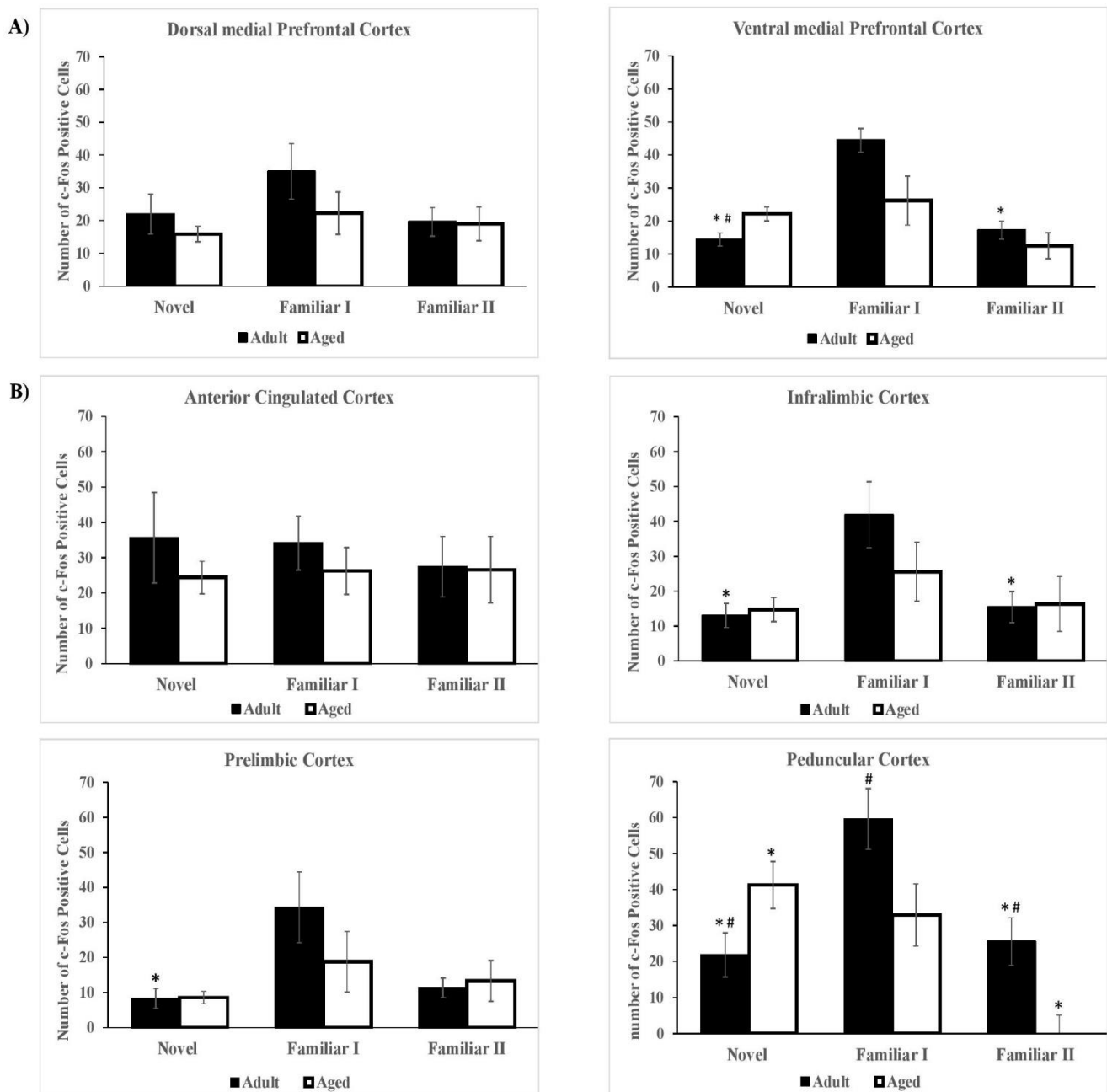


Figure 2. Mean (\pm SEM) number of c-Fos positive cells in the mPFC regions according to a) dorsal versus ventral subdivision b) anterior cingulate cortex (ACC), prelimbic cortex (PrL), infralimbic cortex (IL) and dorsal peduncular cortex (DP). * vs. Familiar I group; # adult vs. aged groups.

Regarding dmPFC and vmPFC, after analyzing the homogeneity of variance (Levene $F(6, 5607) = 0.582, p = .74$), two-way ANOVAs indicated a significant interaction age x familiarity in vmPFC [$F(2,34)=4.850; p<.05, \eta^2 = .22$] but not in dmPFC. Analysis of the interaction revealed a significant effect of familiarity [$F(2,17)=34.144; p<.01, \eta^2 = .82$] in adult rats. Post-hoc Bonferroni tests showed a higher number of c-Fos positive cells in the Familiar I group than in the Novel ($p < 0.01$) and the Familiar II ($p < 0.01$), while these latter two groups did not differ in c-Fos positive cells. A one-way ANOVA of the factor familiarity in aged groups did not reach significance. However, old rats exhibited higher c-Fos immunoreactivity than adult rats during drinking the novel vinegar solution for the first time ($p < .05$).

For to the more conventional division of mPFC in ACC, PrL, IL, and DP, after analyzing the homogeneity of variance (Levene $F(50, 1924) = 1.924, p = .12$), we performed independent 2 x 3 (age x familiarity) ANOVAs for each area. No significant effects of the main factor or interaction were found in ACC. In PrL the analysis yielded only a significant effect of the main factor familiarity [$F(2,34)=5.158; p<0.05, \eta^2 = .22$]. Bonferroni post-hoc test revealed a higher number of c-Fos positive cells in the Familiar I group in comparison with the Novel

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats ($p < 0.05$) but not the Familiar II group. Similar results were found in IL, where only the main factor familiarity was found significant [$F(2,34)=5.377$; $p < 0.01$, $\eta^2 = .24$]. Nonetheless, in this case the Bonferroni test showed a higher number of c-Fos positive cells in the Familiar I group than both in the Novel ($p < 0.05$) and Familiar II ($p < 0.05$) groups. Regarding DP, in addition to a significant main effect of familiarity [$F(2,34)=6.064$; $p < 0.01$, $\eta^2 = .33$], the interaction age x familiarity was also found significant [$F(2,34)=6.064$; $p < 0.01$, $\eta^2 = .26$]. Analysis of the interaction revealed significant main effects of the familiarity factor in both adult [$F(2,15)=8.524$; $p < 0.01$, $\eta^2 = .53$] and aged rats [$F(2,19)=6.306$; $p < 0.01$, $\eta^2 = .39$]. But interestingly enough, the Bonferroni-corrected test revealed a different pattern of c-Fos expression for each age group. Adult rats showed a similar pattern to the one found in other mPFC subdivisions, exhibiting a higher number of c-Fos positive cells in the Familiar I group than both the Novel ($p < 0.01$) and the Familiar II ($p < 0.05$) groups. However, aged rats exhibited a higher number of c-Fos positive cells in the Novel group than in the Familiar II ($p < 0.01$), and a tendency to a higher number of c-Fos positive cells in the Familiar I group in comparison with the familiar II ($p = .06$). Comparisons between aged and adult groups yielded significant differences in all the familiarity conditions. Aged rats exhibited higher c-Fos expression than adult rats in

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats the Novel condition ($p=0.05$) but lower in Familiar I ($p=0.05$) and Familiar II ($p=0.05$) conditions, thus indicating a different pattern of activity in DP for old and adult rats.

5. Discussion

Our results demonstrate for the first time changes in mPFC activity associated with taste recognition memory which are altered by aging. These changes cannot be attributed to age-related differences in taste volume consumption or other non-specific motivational changes because no differences between adult and aged groups were found in water or vinegar intake. The use of two different classifications of mPFC subdivision allows us to draw accurate conclusions about the role of different mPFC regions. Using a dorso-ventral division, our data indicate that ventral but not dorsal mPFC increases c-Fos expression during the second taste exposure in comparison with the first and the sixth exposures in adult rats. This supports the potential involvement of vmPFC in the formation of safe taste memory but not in the neophobic response nor in taste memory long-term maintenance. This finding is confirmed and extended by a more precise analysis using the second classification in which we included PrL and IL, as the most frequent regions used in memory studies, and we add ACC and DP. The results confirmed the same activity pattern in PrL, IL and DP. A similar activity

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats

pattern in adult rats has been previously reported in the nucleus accumbens shell (A. B. Grau-Perales et al., 2019a) which is consistent with the proposed mPFC-accumbens shell interaction relevant for familiarization (Bimpisidis et al., 2013). As these authors propose it is conceivable that vmPFC codes for the generic motivational value of the taste which in the present experiment is increased during AN. However, it seems that the vmPFC role is limited to the process of changing the motivational value of the taste since the activity decays when the taste is already familiar and safe. The fact that vmPFC acts modulating accumbens shell activity is supported by the similar activity pattern in both brain areas. Our results are also in accordance with a previous report of increased PrL and IL c-Fos expression associated with CTA extinction (Mickley et al., 2005), thus supporting a general role of the ventral regions of mPFC in flexible behavioural shifting (Heidbreder & Groenewegen, 2003). However, we would like to stress that, as far as we know, ours is the first study reporting a similar activity pattern specifically in DP. Given that DP maintains bilateral connections with the nucleus of the solitary tract and ipsilateral connections with the parabrachial nucleus as well as interaction with the insular cortex, all of them being areas that integrate taste and visceral inputs contributing to the taste hedonic value, the above proposed role of vmPFC in the

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats

modulation of the hedonic shifting of the taste as it becomes familiar can be attributed to DP. Moreover, DP seems to be the most vulnerable mPFC region to the aging impact on AN. While there seems to be a non-significant tendency to reduced PrL and IL activity in the Familiar II older group, a clear different pattern appears in all DP older groups. In comparison with adult groups, older rats exhibit increased DP activity associated with taste novelty. This activity decays as the taste becomes familiar and dramatically decreases when the familiarization process is consolidated. This changing activity pattern does not seem to be attributable to age-related sensory deficits since it changes depending on taste familiarity. Moreover, there is no previous evidence of aging-related taste processing impairments affecting the conventional stimuli used in standard taste learning tasks (Gámiz & Gallo, 2011). This pattern is opposite to that found in the perirhinal cortex of aged rats. Aged rats exhibit lower c-Fos expression than adult rats during the first exposure to vinegar but higher during the sixth exposure (Gómez-Chacón et al., 2015). This might suggest a reciprocal inhibitory relationship between both brain areas in taste neophobia and AN so that the decreased perirhinal cortex activity induced by aging would increase DP activity and viceversa. The DP activity pattern of aged rats is also opposite to that exhibited by aged rats in the nucleus accumbens shell, thus supporting

Prefrontal cortex Activity pattern during taste neophobia habituation in adult and aged rats reciprocal modulation between both areas. Even though DP shares neuroanatomical characteristics with both PrL and IL (Heidbreder & Groenewegen, 2003), research on drug seeking behavior suggests that DP might be functionally distinct (Willcocks & McNally, 2013).

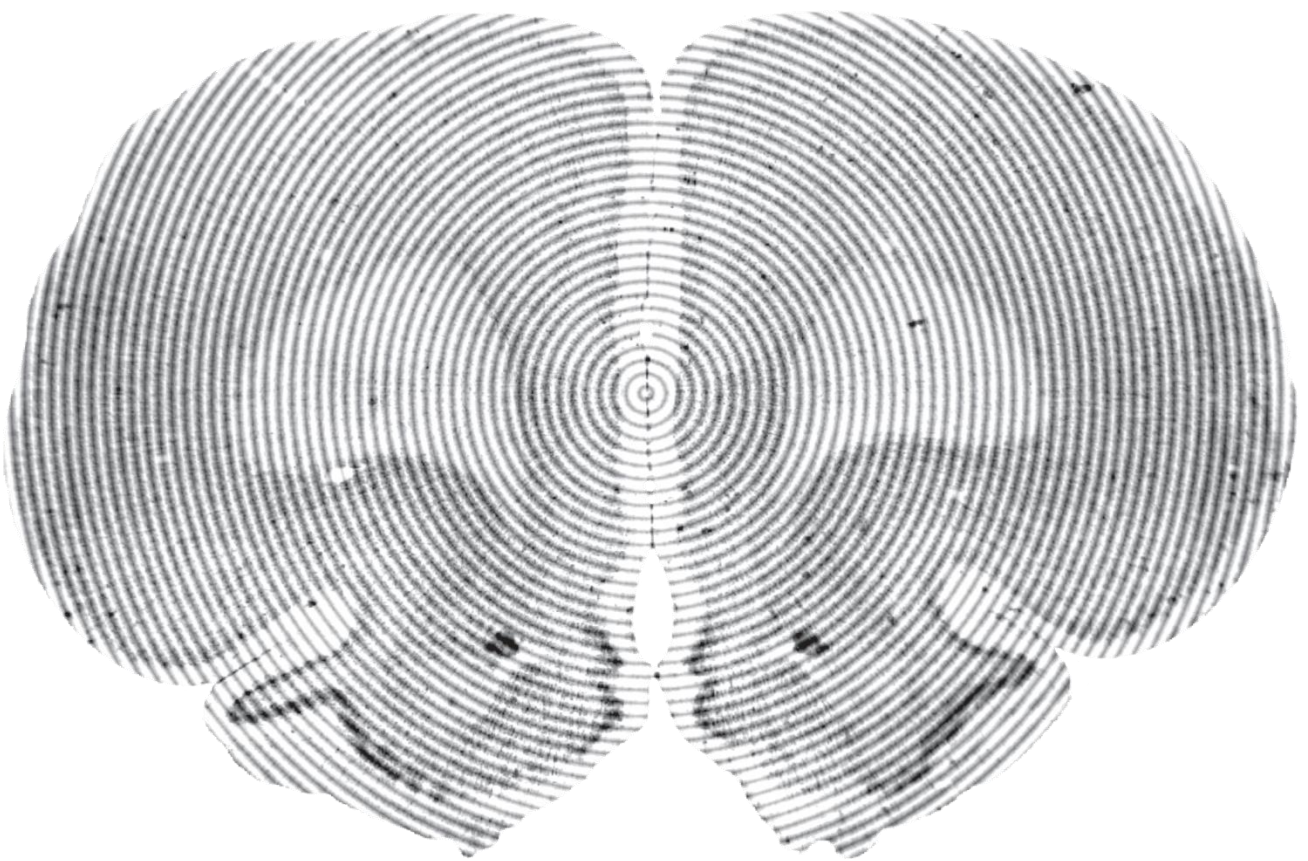
In all, our results support the involvement of vmPFC in the formation of the safe taste memory during the first stages of AN, thus supporting the value of the dorso-ventral division of mPFC. However, a further distinction between ACC, PrL, IL and DP areas unveiled a selective aging impact on DP. This opens new questions on the role of DP in taste memory and prompts research on its interaction with a proposed network mediating neophobia and its attenuation that includes perirhinal cortex, amygdala, insular cortex and accumbens nucleus.

6. Acknowledgments

Supported by the research project PSI2017-86381-P (MICINN, Spain) and BES-2015-072307 predoctoral fellowship to A. Navarro-Expósito (MECD, Spain). This research is part of the Ph.D. thesis performed by A. N. Expósito at the doctoral program in Psychology of the University of Granada. The authors of this manuscript state that there are no actual or potential conflicts of interest.

Capítulo 4

**TASTE NEOPHOBIA, LATENT
INHIBITION OF TASTE AVERSION
AND OBJECT RECOGNITION
MEMORY IN ADOLESCENT RATS**



1. Abstract

Adolescence in mammals is a period marked by peculiar behavior related with pronounced reorganization of cognitive and emotional brain networks. Typically, it has been characterized by increased novelty-seeking, risk-taking, and also an increased emotional responsivity to the stressful properties of novel stimuli. Thus, the combination of novelty-seeking and higher anxiety to stressful stimuli might play a crucial role to provide the necessary skills for survival. However, little is known about adolescent's reaction to novel tastes and their neophobic response. Four experiments were carried out with the aim of evaluating taste neophobia and memory processes in adolescent (PND28) and adult (PND70) Wistar rats. In Experiments 1 and 2 the attenuation of taste neophobia to a cider vinegar (3%) and a saccharin (0,1%) solution was evaluated respectively. Additionally, recognition memory was assessed for both a taste (latent inhibition task in Experiment 3) and object (novel object recognition task in Experiment 4) in order to test the memory role in the neophobia process during adolescence.

Adolescent rats exhibit similar taste novelty-seeking to adult rats. Moreover, more exposure trials were required to attenuate the neophobic response to the vinegar solution but not the saccharin solution

in adolescent rats. This cannot be attributed to an immature memory system since latent inhibition and object recognition memory remained intact. Overall, our results indicate that adolescent rats are able to reduce the ingestion of novel tastes and that taste neophobia is even more affected than in adults by the aversive taste palatability.

2. Introduction

Adolescence in mammals is a developmental period defined as the transition from the infantile dependence on parental protection to the adult independence. This period is marked by a peculiar adolescent behavior associated with pronounced reorganization of cognitive and emotional brain networks. Since reaching the adult independence requires exploring novel peers, environments and foods, perhaps the most prominent feature of the adolescent behavior is increased novelty-seeking which is often associated with increased risk-taking that renders the adolescent more vulnerable to harm (Kelley, 2004). Adolescent novelty-seeking seems to be highly conserved across the species being rodents one of the most studied models (Spear, 2000; Varlinskaya & Spear, 2006). It is widely accepted that novelty seeking during adolescence has adaptive value favouring the acquisition of skills and resources required for independent survival. However, understanding novelty-seeking during adolescence is complex because it seems to be modulated by changes in the sensitivity to the emotional value of the stimuli which might protect survival in novelty-induced stressful situations. Hence, novelty-seeking in various domains should be assessed since they can lead to different outcomes.

Regarding the physical environment it has been reported that novel object exploration increases with age from weaning to adolescence (Ramsaran et al., 2016). In comparison to adults, adolescent rats exhibit increased exploration of novel objects (Douglas et al., 2003; Philpot & Wecker, 2008; Stansfield & Kirstein, 2006). Likewise increased exploratory behavior of a novel environment has been repeatedly reported in adolescents in comparison to adults by assessing the total distance moved in the open-field test which is a non-structured open arena surrounded by walls (Lundberg et al., 2019; Lynn & Brown, 2010; Philpot & Wecker, 2008; Stansfield & Kirstein, 2006). However, a more precise evaluation of the exploratory behaviour in this test evidences greater adolescent avoidance of the risky central area of the arena (Lynn & Brown, 2010) and increased velocity crossing the center in comparison to adults (Lundberg et al., 2019). This might be attributed to increased adolescent emotional responsivity to the stressful properties of the novel environment as indicated by the higher number of fecal boluses in comparison to adult (Lundberg et al., 2019). It is also in accordance with the higher anxiety levels reported during the adolescence using other behavioural and physiological indexes. Accordingly, in the elevated plus maze which consists of two open and two covered arms, adolescent male rats exhibit lower exploration of the risky open arms than adult (Lynn &

Brown, 2010). Moreover, adolescent rats show increased body weight suppression and slower recovery of the plasma corticosterone levels rise in response to restrain-induced stress (Doremus-Fitzwater et al., 2009). The peculiar combination of increased novelty-seeking and higher anxiety induced by stressful novel stimuli might play a crucial role to provide the acquisition of adult abilities favouring survival in risky novel environments during the adolescent developmental period.

Unlike the natural tendency in adults to explore novel objects and environments which seems to be increased during adolescence, there is reluctance to ingest novel tastes with unknown consequences, a phenomenon termed taste neophobia that exhibit adaptive changes throughout the life cycle (Gallo, 2018). Taste neophobia is typically studied in the laboratory giving access to a novel taste solution without caloric content in a one-bottle drinking session with duration in the range of minutes. In order to protect survival, the ingestive behavior heavily relies on the assessment of post-ingestional consequences that can be either aversive or appetitive. If consumption is followed by visceral distress a conditioned taste aversion (CTA) will take place and consumption will decrease. However, if the taste is not followed by aversive consequences the attenuation of taste neophobia (AN) will take place and consumption will increase in later encounters. As proposed by

Reilly and Bornolova (2005) additional daily drinking sessions are required to assess AN as the taste becomes familiar.

Studies that systematically have assessed taste neophobia and AN in adolescent rats are lacking. Adolescent rats have been reported to increase food intake which can be associated with the rapid growth spur during this developmental period. This increased intake is particularly evident regarding palatable tastes. Thus, in comparison to adult rats there are some indications that adolescents increase consumption of sweet caloric solutions, such as sweetened condensed milk (Friemel et al., 2010) and some sucrose concentrations. Hence, in a 48 h multiple bottle choice test Vaidya et al. (Vaidya et al., 2004) demonstrated that adolescents drank significantly 6% and 30% sucrose solutions more than adults but their intake of 14% and 22% sucrose solutions as well as water did not differ. Also, adolescent rats drank more 1.0% sucrose solution than adult across 14 days in 24 h two bottle choice test with access to sucrose and water (Wilmouth & Spear, 2009). This seems to be related to the reported increased adolescent sensitivity to the appetitive properties of sucrose since the authors demonstrated increased orofacial positive responses induced by different sucrose concentrations indicating higher palatability (Wilmouth & Spear, 2009). Therefore, enhanced sweet

solutions consumption has been interpreted as an increased sensitivity of adolescents to the appetitive properties of natural rewards.

Regarding taste neophobia, very little is known about its expression during adolescence. In the control group of a nicotine-induced CTA experiment Dannenhoffer and Spear (2016) reported similar neophobia to a 3% sucrose + 0,125% saccharin solution in adult and adolescent rats. Also, some indication of reduced neophobia to a 6% sucrose solution in adolescents was found by Vaidya et al (2004) in their above mentioned 48 h multiple bottle choice test since they exhibit higher consumption during the initial 4 h in comparison to adults. However, in both cases the taste solutions had rewarding caloric properties and AN was not evaluated.

The present series of experiments was aimed to evaluate taste neophobia and related memory processes in adolescent rats using the standard procedures applied in adult rats. We have previously reported in adult rats that neophobia to a cider vinegar solution and its attenuation is associated with neural activity changes in the nucleus accumbens (Grau-Perales, Gómez-Chacón, & Gallo, 2019), amygdala (Gómez-Chacón et al., 2012, 2016) and prefrontal cortex (Expósito et al., 2020). Given that these areas form part of the reward brain networks undergoing great reorganization during adolescence, it can be hypothesized that taste

neophobia might exhibit peculiar features in adolescent rats. In the Experiment 1 we have compared the performance of adolescent and adult rats in vinegar neophobia and AN. In order to assess a potential effect of taste palatability in the Experiment 2 neophobia to a sweet non-caloric saccharin solution was evaluated. Additionally, potential effects of immature memory processes during adolescence were tested in taste learning (Experiment 3) and object recognition memory tasks (Experiment 4). Given that there is some evidence of higher novel object exploration in adolescent male than female (Douglas et al., 2003) the effect of sex was also examined throughout the entire series.

3. Experiment 1

To our knowledge there are not previous studies aimed to assess taste neophobia in adolescent rats using non-caloric tastants. Therefore, we have applied to adolescent male and female rats a standard procedure used in our laboratory to explore the brain mechanisms of vinegar neophobia and the effect of aging (Exposito et al., 2020; Gómez-Chacón et al., 2012, 2016; Grau-Perales, Gómez-Chacón, Morillas, et al., 2019; Grau-Perales, Gómez-Chacón, & Gallo, 2019; Grau-Perales & Gallo, 2020; E Morillas et al., 2017). Based on the reported increased novelty-seeking and given the high need of finding nutrients sources in novel

environments during this rapid body growth period, it is expected a reduced taste neophobia in adolescents in comparison to adults. This can be expected especially in males since they venture out from the nest into novel territories (Kelley, 2004; Spear, 2000).

3.1. Method

3.1.1. Subjects

A total number of 64 male (n= 37) and female (n= 27) Wistar rats were assigned to one of four experimental groups defined by the postnatal day (PND): adolescent (PND28; n= 29,) and adult (PND70; n= 35) and two experimental conditions: VIN (N= 38) and Water (N= 26). Sex was counterbalanced in each group.

All animals were born in the breeding colony of the University of Granada. On PND2 the litters were culled to 12 pups balancing sex as much as possible. After weaning on PND17, the animals were housed individually with water and food available ad libitum. The humidity was kept at 55% and the temperature at 20-24°. The animals were maintained on a 12-hour light-dark cycle (lights on at 08:00) and the experimental procedures were carried out in the light phase. The procedures were approved by the University of Granada Ethics Committee for Animal

Research and by the Regional Ministry of Agriculture, Fisheries and Rural Development of Andalusia (17-02-15-195).

3.1.2. Procedure

All subjects were subjected to the same behavioral procedure, which consisted of daily 15-minute morning drinking sessions in which consumption was recorded and additional 20-min rehydration sessions in the afternoon. Food was available ad libitum throughout all the experimental procedure. Adolescent rats were water deprived on PND28 (mean body weight of males 67.73 ± 3.28 g and females 69.20 ± 2.04 g) and adult rats on PND70 (mean body weight males: 308.7273 ± 5.61 g and females: 206.16 ± 3.30 g). Water intake in the morning drinking session was recorded for 7 days during the acclimation period to the deprivation schedule. Once the water intake baseline (BL) was stabilized the experimental sessions began. The rats belonging to the VIN group had access during the 5 following days to a 3% (vol/vol) cider vinegar solution during the daily morning drinking sessions and consumption (ml) was recorded after each session. Animals belonging to the Water control group drank water throughout the experiment. In order to allow comparisons between different age groups an intake index was calculated by obtaining the percentage of ingested solution during the experimental

drinking sessions in comparison with that of the last baseline day ($Day_{gr} \times 100$)/ LB_{gr}). Thus, the lower the index, the higher taste neophobia.

3.2. Results

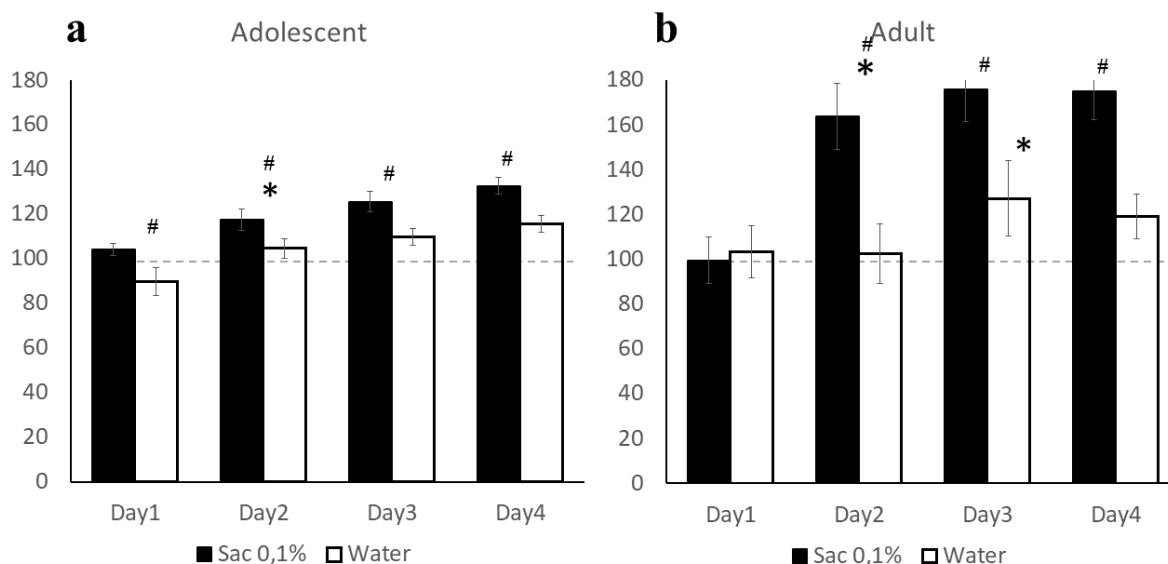


Fig 1. (A) Intake rate with respect to baseline of Adolescent group during the four cider-vinegar solution (Vin 3%) exposures. *vs Previous day ($p < .05$), #vs Water group ($p < .05$); **(B)** Intake rate with respect to baseline of Adult group during the four cider-vinegar solution (Vin 3%) exposures. *vs Previous day ($p < .05$), #vs Water group.

There were no differences between the groups in water intake the last BL day [$F(1, 67) = 1.29, p = .26$], except for the fact that males exhibited higher intake than females [$F(1, 67) = 8.45, p = .00, \eta^2 = .112$]. There were no differences either between the adolescent groups in the body weight gain throughout the experimental procedure [$F(1, 25) = .84, p = .937$]. Fig. 1 shows mean intake indexes of the different adolescent (Fig. 1a) and adult (Fig. 1b) groups along the experimental days.

A global mixed 2 (Age) x 2 (Sex) x 2 (Group) x 4 (Day) repeated measures ANOVA was carried out. The assumption of sphericity was not met, assessed by Mauchly's test of sphericity [Mauchly (9, 170) = 0,516, $p = .00$], and Greenhouse & Geisser (Greenhouse & Geisser, 1959) was used to correct global mixed repeated measures ANOVA in this group. Analysis yielded a significant effect of Day [$F(3,170)=13.422$; $p=.00$, $\eta^2 = .193$], interaction Age x Day [$F(3,170)=8.115$; $p=.00$, $\eta^2 = .127$], Group x Day [$F(3,170)=11.856$; $p=.00$, $\eta^2 = .175$] and a triple interaction Age x Group x Day [$F(3,170)=2.644$; $p=.05$, $\eta^2 = .045$] but no effect or interaction of the Sex factor. Analysis of the triple interaction showed an effect of Day [$F(3,70)=4.035$; $p<.05$, $\eta^2 = .130$] and an interaction Group x Day [$F(3,70)=4.918$; $p=.00$, $\eta^2 = .154$] in the adolescent group, and also an effect of Day [$F(4, 136)=28.817$; $p=.00$, $\eta^2 = .459$] and interaction Group x Day [$F(4,136)=14.072$; $p=.00$, $\eta^2 = .293$] in the adult group.

A paired samples T-test showed a higher consumption of the vinegar solution in the third day than the second day in the adolescent rats [Day 2 (M=68.18; SD=20.21) < Day 3 (M=97.65; SD=18.92), $t(15)=-29.468$, $p=.00$] but no differences in the consumption of vinegar solution between the first and second day [Day 2 (M=78.86; SD=32.01) < Day 3 (M=68.18; SD=20.21), $t(15)=.921$, $p=.371$]. However, adults rats showed

higher consumption in the second day compared to first day [Day 1 ($M=41.18$; $SD=10.97$) < Day 2 ($M=71.08$; $SD=19.80$), $t(21)=-9.619$, $p=.00$] (Figs. 1a, 1b), suggesting a delayed AN in the adolescent group compared to the adults.

With the aim of explore age differences through taste presentation days (day 1-4) it was carried out unifactorial 2 (Group) x 1 (Day) ANOVA in adolescent and adult groups. Results revealed that adolescent rats showed a lower consumption of the Vin 3% group vs Water group in the first [$F(1,27)=7.601$; $p=.01$, $\eta^2 = .220$] and second day [$F(1,27)=27.786$; $p=.00$, $\eta^2 = .507$], but not in the third day [$F(1,27)=0.490$; $p=.490$, $\eta^2 = .018$] and fourth day [$F(1,27)=0.215$; $p=.646$, $\eta^2 = .008$]. Regarding adult rats, results revealed a lower consumption of the Vin 3% group compared Water group in the first day [$F(1,34)=68.940$; $p=.00$, $\eta^2 = .670$], second day [$F(1,34)=30.957$; $p=.00$, $\eta^2 = .477$], third day [$F(1,34)=17.103$; $p=.00$, $\eta^2 = .335$] and fourth day [$F(1,34)=10.635$; $p=.00$, $\eta^2 = .238$].

The triple interaction analysis also showed an effect of Day [$F(3, 100)=38.348$; $p=.00$, $\eta^2 = .516$] and an interaction Age x Day [$F(3, 100)=11.846$; $p=.00$, $\eta^2 = .248$] in the Vin 3% group, due to adolescent rats consumed higher amount of vinegar solution than adult rats in the first [$F(1, 36)=26.452$; $p=.00$, $\eta^2 = .424$], third [$F(1, 36)=27.109$; $p=.00$, $\eta^2 = .430$] and fourth [$F(1, 36)=9.367$; $p=.00$, $\eta^2 = .206$] days, but no the

second day [$F(3, 63)=0.195$; $p=.661$, $\eta^2 = .005$]. No effect of Day [$F(3, 63)=1.410$; $p=.251$, $\eta^2 = .053$] or interaction Age x Day [$F(3, 63)=1.007$; $p=.385$, $\eta^2 = .039$] was found in the Water group.

4. Experiment 2

The results of Experiment 1 indicated vinegar neophobia both in adolescent and adult rats. Even though the taste intake indexes were higher in adolescents thus suggesting lower taste neophobia as hypothesized, adolescent rats required a higher number of trials in order to show AN. While adult rats reached the asymptote of vinegar consumption after the first drinking session, adolescents required two sessions. Hence, a higher intake of the taste solution is in accordance with the reported increased consummatory behavior during adolescence, but the delayed AN might reflect either increased taste neophobia thus requiring more exposures to be attenuated or alternatively a maturational deficit of the memory mechanisms involved in recognizing a familiar taste. Increased taste neophobia does not seem to have an adaptive value except if it is modulated by other features of the taste solution such as palatability which might allow the animals to predict the outcome of consumption. In fact, increased adolescent sensitivity to

sweet tastes associated to caloric properties has been reported (Friemel et al., 2010; Wilmouth & Spear, 2009) while there is controversial results with respect to the sensitivity to aversive tastes. Wilmouth and Spear (Wilmouth & Spear, 2009) reported that adolescent male but not female rats exhibited decreased negative orofacial responses to quinine in comparison to adults. However, hypersensitivity to an aversive 0.1M sodium solution has been reported in human female adolescents (Galvan & McGlennen, 2013).

Therefore, in order to explore the effect of taste palatability on adolescent taste neophobia and AN, a sweet highly palatable saccharin solution was used in the Experiment 2 instead of the sour vinegar solution applied in the Experiment 1.

4.1. Method

4.1.1. Subjects

A total number of 61 male and female naïve Wistar rats were assigned to one of four experimental groups defined by age: adolescent (n= 33, PND28) and adult (n= 28, PND70) and two experimental conditions: Saccharin (N= 30) and Water (N= 31). Sex was counterbalanced in each group. Mean body weight at the beginning of the behavioral procedure was in the adolescent groups 114.61 ± 3.09 g

(males) and 104.47 ± 3.64 g (females) and in the adult groups 568.5 ± 25 g (males) and 295.38 ± 12.59 g (females). Breeding and housing conditions were the same as described in Experiment 1.

4.1.2. Behavioral procedure

The behavioral procedure was identical to that described in Experiment 1 except for the taste solution available during the experimental morning drinking sessions which consisted in a 0.1% (w/vol) sodium saccharin solution.

4.2. Results

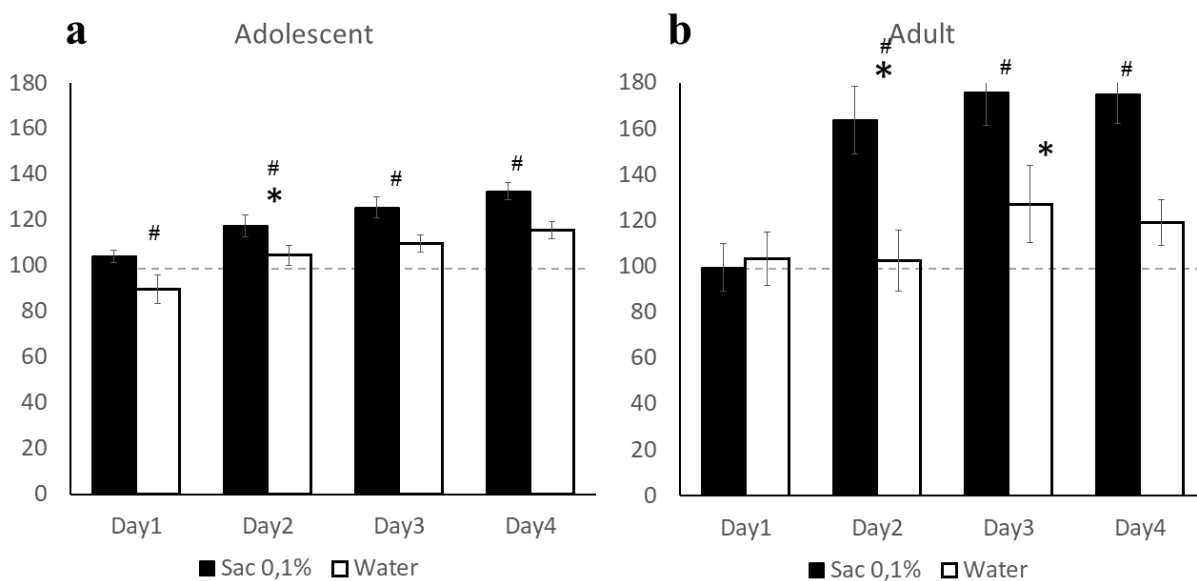


Fig 2. (A) Intake rate with respect to baseline of Adolescent group during the four saccharin solution (Sac 0,1%) exposures. *vs Previous day ($p < .05$), #vs Water group ($p < .05$); **(B)** Intake rate with respect to baseline of Adult group during the four saccharin solution (Sac 0,1%) exposures. *vs Previous day ($p < .05$), #vs Water group.

There were no differences between the groups in water intake the last BL day [$F(1, 53) = 1.05, p = .31$], except for the fact that males exhibited higher intake than females [$F(1, 53) = 22.12, p = .00$]. There were no differences either between the adolescent groups in the body weight gain throughout the experimental procedure [$F(1, 25) = .74, p = .599$].

Fig. 2 shows mean intake indexes of the different adolescent (Fig. 2a) and adult (Fig. 2b) groups along the experimental days. The assumption of sphericity was not met [Mauchly (9, 170) = 0,516, $p = .00$] and Greenhouse & Geisser (Greenhouse & Geisser, 1959) was used. A global mixed 2 (Age) x 2 (Sex) x 2 (Group) x 4 (Day) repeated measures ANOVA yielded significant effects of Day [$F(3,157) = 35.434; p = .00, \eta^2 = .401$], Group x Day [$F(3,157) = 8.900; p = .00, \eta^2 = .144$], Age x Day [$F(3,157) = 5.438; p = .00, \eta^2 = .093$] and a triple interaction Group x Age x Day [$F(3,157) = 5.585; p = .00, \eta^2 = .095$], but not effect or interaction with the factor Sex.

The analysis of the triple interaction indicated an effect of Day [$F(3,86) = 21.710; p = .00, \eta^2 = .412$] and an interaction Group x Day [$F(3,86) = 14.237; p = .00, \eta^2 = .315$] in the adolescent group, an effect of Day [$F(3,71) = 16.947; p = .00, \eta^2 = .395$] and interaction Group x Day [$F(3,71) = 6.982; p = .00, \eta^2 = .212$] in the adult group. The analysis of the Group x Day interaction in adolescent and adult rats showed higher

saccharin solution consumption in the second day than the first day in adolescent [Day1 (M=104.28; SD=11.01) < Day2 (M=117.48; SD=18.78), $t(15) = -3.425, p = .00$], and in adult rats [Day 1 (M=99.59; SD=38.54) < Day 2 (M=163.73; SD=55.32), $t(13) = -5.246, p = .00$] (Figs. 2a, 2b). This can be interpreted as AN on the second day of the saccharin solution presentation in the adolescent and also in the adult group.

With the aim of explore groups differences on the different taste presentation days (days 1-4) unifactorial 2 (Group) x 1 (Day) ANOVAs in adolescent and adult groups were applied. The results revealed a higher consumption of the Sac 0.1% group vs Water group in the first [F(1,31)=4.273; $p < .05, \eta^2 = .121$], second [F(1,31)=3.980; $p < .05, \eta^2 = .114$], third [F(1,31)=7.213; $p < .05, \eta^2 = .189$] and fourth [F(1,31)=9.685; $p = .00, \eta^2 = .238$] days in the adolescent group. Regarding the adult group, the results revealed a higher consumption of the Sac 0.1% group compared with the Water group only the second [F(1,26)=9.384; $p = .00, \eta^2 = .265$], third [F(1,26)=4.847; $p < .05, \eta^2 = .157$], and fourth day [F(1,26)=12.144; $p = .00, \eta^2 = .318$], but no significant differences between Sac 0.1% and water consumption the first [F(1,26)=0.062; $p = .805, \eta^2 = .002$] day of presentation of the taste. These results are consistent with the greater palatability of saccharin and therefore a greater consumption. The analysis also showed an effect of Day [F(3, 80)=33.340; $p = .00, \eta^2$

=.544] and an interaction Age x Day [$F(3, 80)=8.607$; $p=.00$, $\eta^2 = .235$] in the Sac 0.1% group, and an effect of Day [$F(3, 80)=6.175$; $p=.00$, $\eta^2 = .176$] but no interaction Age x Day [$F(3, 80)=1.116$; $p=.345$, $\eta^2 = .037$] in the Water group. Moreover, the analysis of the interaction Age x Day in the Sac 0.1% group by carrying out an Unifactorial 2 (Group) x 1 (Day) ANOVA revealed that, contrary to the results showed in the Experiment 1, the adolescent rats consumed a lower amount of the saccharin solution than adult rats in the second [$F(1, 30)=9.919$; $p=.00$, $\eta^2 = .262$], third [$F(1, 30)=12.747$; $p=.00$, $\eta^2 = .313$] and fourth [$F(1, 36)=11.688$; $p=.00$, $\eta^2 = .294$] days, but no significant differences were found in the consumption of the saccharin solution the first day [$F(1, 30)=0.218$; $p=.644$, $\eta^2 = .008$].

5. Experiment 3

The results of Experiment 2 confirm neophobia to the sweet taste solution both in adolescent and adult groups as evidenced by increased consumption as the taste becomes familiar. Moreover, AN takes place after one session both in adolescent and adult groups, thus indicating no differences in the strength of taste neophobia when a palatable solution is used in contrast to the results of the Experiment 1 using a less palatable vinegar solution. Thus, the results of the Experiment 1 exhibiting slower

AN to the vinegar solution might be attributable to stronger neophobia and support an adaptive modulation of taste neophobia by taste palatability. Nevertheless, altered adolescent taste recognition memory due to ontogenetic changes in the organization of the brain systems involved in learning and memory cannot be excluded. In fact, emotion has been proposed to be predominant with respect to cognition during adolescence due to the imbalance between the maturational courses of different brain circuits and their interaction (Casey et al., 2019).

In order to explore the performance of adolescent rats in comparison to adult rats in other taste memory procedure, the Experiment 3 was aimed to assess latent inhibition (LI) of taste aversion learning in both age groups. Latent inhibition is a well known learning phenomenon relying on the memory of previous experiences (Lubow, 1973; Lubow & Weiner, 2010). Previous exposures not followed by relevant consequences retard later conditioning to the same stimulus. This effect has been described in different learning tasks, including conditioned taste aversion (CTA). Latent inhibition of CTA requires a two-stage behavioral procedure. In the first stage, a taste is pre-exposed and in the second, the same taste is followed by aversive consequences. Attenuation or disruption of the learned aversion by previous exposures is assessed in a later one-bottle test. Hence, in the Experiment 3 we have

taken advantage of the saccharin preexposure applied in the previous experiment to induce a later aversion in the same animals so that LI could be assessed.

5.1. Method

5.1.1. *Subjects*

All the subjects used in the Experiment 3 received an additional CTA procedure in order to explore the effect of the previous taste exposure on later learning. They were randomly assigned to the following groups according to each experimental condition: adolescent saccharin pre-exposed group (n=16; 8 male, 8 female), adolescent non pre-exposed group (n=17; 9 male, 8 female), adult pre-exposed group (n=14; 7 male, 7 female) and adult non pre-exposed group (n=14; 7 male, 7 female).

5.1.2. *Behavioral procedure*

On the following day to the behavioral procedure described in Experiment 2, i.e., Day 5, all the animals had 15 min access to 0.1% saccharin solution and the amount drunk was recorded. Thus, non-pre-exposed control groups drank the saccharin solution for the first time while the pre-exposed groups drank the familiar saccharin solution for

the fifth time. Fifteen minutes after the end of the saccharin drinking session, all the animals received an i.p. injection of lithium chloride (LiCl, 0.15 M; 2% b.w.) and returned to the home cage. The next day they were allowed to recover from the LiCl-induced visceral distress with access to water during both drinking periods.

On Day 6 one-bottle test was performed during the morning drinking session being only one tube containing the saccharin solution available to all the groups. Intake was recorded and a rate was calculated with respect to LB to be able to compare the intake between adolescent and adult rats.

On Day 7 a two-bottle test was performed during the morning drinking session with one tube containing Sach 0,1% and the other containing tap water, with counterbalanced position to avoid tube location preference. Intake was recorded and an aversion index defined as the volume of water consumed/(volume of water + volume of sucrose) ×100 was calculated.

5.2. Results

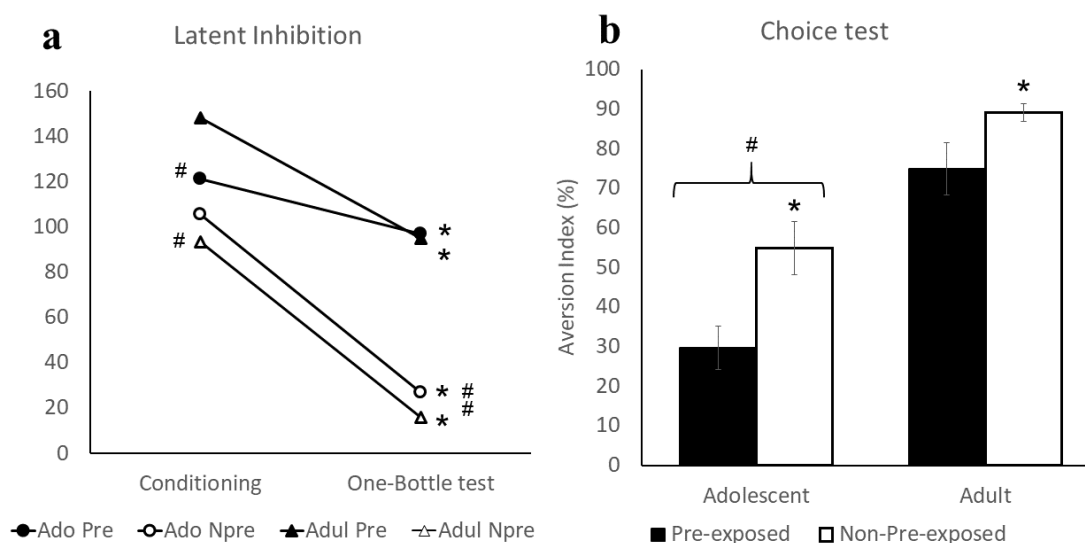


Fig 3. (A) Intake rate with respect to LB during Conditioning session and One-Bottle test (Saccharin 0.1%) on Adolescent Pre-exposed (Ado Pre), Adolescent Non Pre-exposed (Ado NPre), Adult Pre-exposed (Adul Pre) and Adult Non Pre-exposed (Adul NPre). **(B)** Aversion Index during two-bottle test (Sac 0.1% vs water) on adolescent (pre-exposed and non pre-exposed to a saccharin solution 0.1%) and adult (pre-exposed and non pre-exposed to a saccharin solution 0.1%) groups. *vs Pre-exposed ($p < .05$) group, #vs Adult group.

Intake of the vinegar 3% solution by the adolescent and adult groups during the conditioning and one-bottle test sessions is represented in Figure 3a. A mixed 2 (Age) x 2 (Sex) x 2 (Pre-exposure) x 2 (Session) repeated measures ANOVA yielded significant effects of the main factor Session [$F(1,53)=160.429$; $p=.00$, $\eta^2 = .752$] and the interaction Session x Pre-exposure [$F(1,53)=18.331$; $p=.00$, $\eta^2 = .257$], but no effect or interactions of the factors Age and Sex.

The analysis of the Session x Pre-exposure interaction showed a significant decrease in the one-bottle test consumption compared to the conditioning day in both, pre-exposed [Conditioning (Mean (\pm SEM) =133.77(40.84); > One-bottle test (Mean (SD)=96.07(33.61), $t(29)=4.926$, $p=.00$)] and non-pre-exposed groups [conditioning (Mean (SD)=100.30(33.13); > One-bottle test (Mean (SD)=21.74(19.45), $t(30)=-13.045$, $p=.00$)].

The analysis of the interaction also showed that the non-pre-exposed group consumed lower amount of saccharin solution compared to the pre-exposed group in both, conditioning [Pre-exposed (Mean (SD)=133.77(40.84) > Non pre-exposed (Mean (SD)=100.30(33.13), $t(59)=3.520$, $p=.00$)] and one-bottle test [Pre-Exposed (Mean (SD)=96.07(33.61) > Non-pre-exposed (Mean (SD)=21.74(19.45), $t(59)=10.612$, $p=.00$)]. These results demonstrate an intact LI phenomenon, as the previous taste exposure retards the later conditioned aversion. No aged effect was found.

The aversion Indexes during the two-bottle test are shown in Fig. 3b. A 2 (Age) x 2 (Sex) x 2 (Pre-exposure) x 1 (Aversion Index) ANOVA yielded significant effects of Age [$F(1,53)=12.998$; $p=.00$, $\eta^2 = .197$] and Pre-exposure [$F(1,53)=50.442$; $p=.00$, $\eta^2 = .488$] and no other significant effect was found. On the one hand, the analysis of the main Age effect

showed differences between the adolescent and adult groups [Adolescent (Mean (SD)=52.99(32.93) < Adult (Mean (SD)=71.99(25.56), $t(59)=-2.482$, $p=.01$)], thus exhibiting the adolescent group lower saccharin aversion than the adult group. On the other hand, the analysis of the pre-exposure effect yielded significant differences between the groups pre-exposed to saccharin 0.1% and the non-pre-exposed groups [Pre-exposed (Mean (SD)=41.42(25.88) < Non-pre-exposed (Mean (SD)=81.35(21.67), $t(59)=6.539$, $p=.00$], where non-pre-exposed group showed higher aversion to the saccharin solution than pre-exposed group.

6. Experiment 4

According to the results of Experiment 3 adolescent rats did not exhibit taste memory impairment since the LI was evident in both age groups. Pre-exposed groups showed lower saccharin taste aversion than non-pre-exposed groups thus indicating memory of the previous safe taste experience. The lower taste aversion found in both pre-exposed and non-pre-exposed adolescent groups in comparison to the adult groups during the two-bottle test is in accordance to previous reports indicating reduced adolescent sensitivity to the aversive effects of CTA inducing agents (Dannenhoffer & Spear, 2016; Saalfield & Spear, 2019; Vetter-

O'Hagen et al., 2009). In spite of this difference the effect of previous taste experience was similarly evident at both ages.

Experiment 4 was designed in order to assess more extensively the adolescent memory abilities in the spontaneous novel object recognition (NOR) task (Ennaceur & Delacour, 1988). This task is based on the innate preference of the rodents to explore novel objects compared with previously encountered ones. The standard procedure includes a sample phase in which two identical objects are available and a test phase in which one of the objects is substituted by a novel one. Higher exploration of the novel object indicates recognition as the animal remembers the familiar one.

There are reports indicating that adolescent rats show increased exploration of a novel object in a familiar environment in comparison to adult (Douglas et al., 2003; Stansfield & Kirstein, 2006). Although studies on the ontogeny of object recognition memory in rodents using different tasks have yielded controversial results (Westbrook et al., 2014), there is agreement in that adolescent mice (Cruz-Sanchez et al., 2020) and rats (Reger et al., 2009) recognize a novel object in a standard NOR task after a 24 h delay.

Therefore, we applied a standard NOR task to adolescent and adult rats in order to discard a general memory impairment contributing to the delayed AN found in Experiment 1.

6.1. Method

6.1.1. Subjects

A total number of 28 male (n= 14) and female (n= 14) Wistar rats were assigned to one of two experimental groups defined by the age: adolescent (PND28; n=14) and adult (PND70; n= 14). Sex was counterbalanced in each group. Breeding and housing conditions were the same as described in Experiment 1.

6.1.2. Apparatus

The behavioral procedure took place in an open box made of black painted wood (52 x 52 x 40 cm). Two pair of objects consisting of stacked simple figures of decreasing size (cubes tower and spheres tower of 6 cm wide and 12 cm high) were used as novel or familiar objects. Velcro was attached to each object to be secured to the floor. Overhead lighting illuminated the testing area reducing room context information. Sessions was recorded with an overhead video camera and the SMART 3.0 software (Panlab SL) was used for analyzing the exploration behavior.

6.1.3. Behavioral procedure

The behavioral procedure for assessing NOR consisted of three phases. On day 1, habituation to the testing box took place. Each animal was allowed to freely exploring the open-field arena in absence of objects during 5 minutes after previous handling and room acclimatization. On day 2 the sample phase consisted in a 5 min session in which each animal was placed in the open-field arena which contained two identical objects either spheres or cubes tower. The animals were placed into the cage with its head oriented to the opposite direction of the objects location and they were allowed to explore the pair of objects. On day 3, twenty-four hours after the sample phase, object recognition was tested. The rats were placed during 5 minutes in the box and one copy of the object from the sample phase was substituted by a novel object. The exploration time (ET) of each object was recorded in seconds. Object ET was defined as having more than 1 second the rat's head directed to the object with the nose within 2cm of the objects and vibrissae moving. Climbing onto the object (unless the mouse sniffs the object it has climbed on) or chewing the object does not qualify as exploration. Objects and their relative positions were counterbalanced. The arena and objects were cleaned after each session with 70% ethanol to avoid odor cues.

6.2. Results

During the sample phase of the NOR task, the rats explored both copies of the objects equally and there were no differences in ET among the groups.

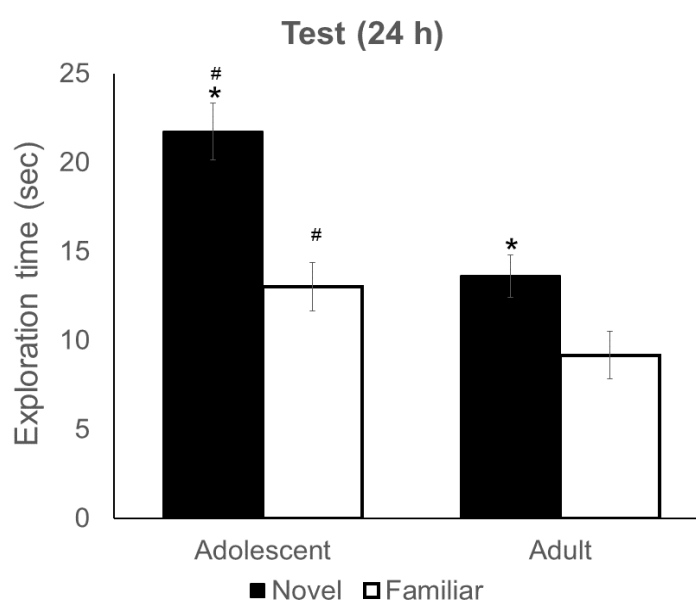


Fig 4. Novel object recognition (NOR) test performance. Mean (+SEM) exploration time of the novel and familiar objects for adolescent and adult groups. *vs Familiar ($p < .05$), #vs Adult.

A 2 (Age) x 2 (Sex) x 2 (Novelty) ANOVA during the test phase showed a main effect of Novelty [$F(1, 24)=38.430$; $p=.00$, $\eta^2 = .616$] and an interaction Novelty x Age [$F(1, 24)=4.046$; $p=.05$, $\eta^2 = .144$], but no interaction Novelty x Sex [$F(1, 24)=0.072$; $p=.79$, $\eta^2 = .003$], nor triple interaction Novelty x Sex x Age [$F(1, 24)=0.109$; $p=.74$, $\eta^2 = .005$].

The analysis of the Novelty x Age interaction yielded a significant effect of Novelty due a longer exploration of the novel object in the adolescent group [Novel (Mean (SD)=21.75(5.98) > Familiar (Mean (SD)=13.02(5.07), $t(13)=-5.666$, $p=.00$)] and adult groups [Novel (Mean (SD)=13.61(4.39) > Familiar (Mean (SD)=9.16(4.96), $t(13)=3.290$, $p=.00$)]. Moreover, adolescent rats spend more time exploring the novel [Adolescent (Mean (SD)=21.75(5.98) > Adult (Mean (SD)=13.61(4.39), $t(26)= 4.099$, $p=.00$)] and familiar object [Adolescent (Mean (SD)=13.02(5.07) > Adult (Mean (SD)=9.16(4.96), $t(26)= 2.034$, $p=.05$)] than adult rats (Fig. 4). These indicate that both age groups remember the previously presented object but the adolescents showed greater general exploratory activity.

7. Discussion

The main finding reported in the present series of experiments is that unlike what has been reported with object and physical environments when it comes to tastes, adolescent rats do not exhibit more novelty-seeking than adults but a similar or even enhanced taste neophobia.

The results of the Experiments 1 and 2 evidenced vinegar and saccharin neophobia respectively in adolescent rats. Moreover, vinegar

neophobia required two exposure trials to be attenuated while saccharin neophobia required only one exposure in contrast to the adult groups that attenuated neophobia to both tastes after one exposure. The delayed AN to a novel vinegar solution in adolescents cannot be attributed to an immature memory system impairing the formation of the safe taste memory. Indeed, taste memory was not impaired in the adolescent groups as demonstrated by an intact LI effect induced by previous taste exposures on CTA (Experiment 3). Also, adolescent rats showed recognition of a familiar object after a 24h delay in a NOR task similarly to adult rats (Experiment 4) thus excluding unspecific global memory deficits as a potential explanation of the slower attenuation of vinegar neophobia.

Therefore, the delayed AN to the sour vinegar solution can be the outcome of a greater vinegar than saccharin neophobia in adolescents. This might reflect a higher sensitivity to the aversive palatability properties of tastes in comparison to adults which would be in accordance with the hypersensitivity reported in humans to aversive salty solutions (Galvan & McGlennen, 2013). These results challenge the claim based on data obtained with other natural rewarding stimuli that adolescents are more responsive to appetitive rewards but less sensitive to negative outcomes (Doremus-Fitzwater et al., 2010). Although

decreased aversive orofacial responses to quinine solution have been reported in adolescent rats, our results support increased responsivity to the novel sour vinegar solution. The value of palatability to enhance the cautious neophobic response to potentially dangerous tastes in adolescents might be adaptive when confronted with poisons thus favoring survival and it is consistent with the evidence of higher responsivity to stressful stimuli during novel environment exploration. Noteworthy, adolescent rats are more cautious than adult rats exploring the risky central areas in the open-field arena (Lundberg et al., 2019; Lynn & Brown, 2010) and the open arms in the elevated plus maze (Lynn & Brown, 2010).

To our knowledge this is the first assessment of taste neophobia in adolescent rats using the standard procedures applied in adult rats. Previous incidental reports of adolescent neophobia to sweet caloric solutions in experiments focused on different aims have yielded controversial results. While Dannenhoffer and Spear (Dannenhoffer & Spear, 2016) reported similar neophobia during 30 min access to a 3% sucrose + 0,125% saccharin solution in adult and adolescent rats, Vaidya et al. (2004) found increased consumption in comparison to adults of a novel 6% sucrose solution in a 4 h drinking session. The authors interpreted this result as reduced neophobia but it cannot be excluded

that the increased consumption could be due to the sucrose rewarding caloric properties that can be detected along a 4h drinking session. This would be in accordance with reports of increased adolescent preference for sweet caloric solutions (Friemel et al., 2010; Vaidya et al., 2004; Wilmouth & Spear, 2009). In spite of the fact that recordings of the orofacial responses indicate that the palatability of the sucrose sweet taste might be enhanced in adolescent rats (Wilmouth & Spear, 2009) we have not found differences in taste neophobia compared to adults using the non-caloric saccharin solution in the Experiment 2. Moreover, the adult group exhibited even a higher increase than the adolescent group in the amount of saccharin drank along the AN sessions.

Therefore, enhanced sweet solutions consumption can be interpreted as an increased sensitivity of adolescents to the appetitive properties of natural rewards while we found no evidence of reduced taste neophobia measuring consumption on a non-rewarding sweet taste solution.

Overall, our results indicate that adolescent rats are able to reduce the ingestion of novel tastes and that taste neophobia is even more affected than in adults by aversive taste palatability. This is the case of the vinegar solution intake which requires more exposures to be recovered as it becomes familiar. Unexpectedly, the reduced ingestion of novel

tastes seems to be contrary to the novelty-seeking that characterizes the adolescent behavior. Nonetheless, it should be taken into account that novelty-seeking has been defined in terms of exploratory behavior of the external environmental cues which involves approaching behavior with immediate consequences. Hence, adolescent rats exhibit increased cautious exploration of novel places (Kristie H & Cheryl L, 2006; Lundberg et al., 2019; Lynn & Brown, 2010; Philpot & Wecker, 2008) and objects (Douglas et al., 2003; Kristie H & Cheryl L, 2006; Philpot & Wecker, 2008; Ramsaran et al., 2016) accompanied by increased stress responsivity (Doremus-Fitzwater et al., 2010; Lundberg et al., 2019; Lynn & Brown, 2010). However, the exploration of chemical cues such as tastes with internal consequences requires monitoring the visceral interoceptive effects of ingestion. Thus, maintaining or increasing the neophobic responses along several trials might reflect increased cautious exploration of tastes by adolescent rat. Taking into account such definition our results are in accordance with increased novelty-seeking during adolescence. Moreover, they point to the need of considering the peculiarities of the interoceptive environment exploration when assessing developmental behavioral changes.

The age range of the adolescent groups used in the present study covers the entire adolescent period in rats according to the most

conservative criteria that establish adolescence from PND28 to PND42 (Spear, 2000). This classification was based on behavioral transitions which included play, exploratory behavior and peer interaction in wild rats as well as on developmental brain events. The age ranges used to define adolescence in rodents might vary from strict definitions covering PND28 to PND 34 (Philpot & Wecker, 2008) to broader definitions extending the adolescence to PND60 (Arenas et al., 2016; Lynn & Brown, 2010). However, in the second case the authors often distinguish several stages. The age range covered in our experiments corresponds to the middle adolescence and it is considered as prototypic adolescence (Varlinskaya & Spear, 2006). We have chosen this conservative range of age in order to assure that assessments have been performed during the adolescence age range.

With respect to the effect of sex our results do not indicate differences between male and female adolescent rats in any of the behavioral tasks applied. Although there are some indications of greater impact of adolescence on males regarding novel objects exploratory behavior (Douglas et al., 2003), response to stress induced by the open arms in the elevated plus maze (Lynn & Brown, 2010) and alcohol consumption (Vetter-O'Hagen et al., 2009), the evidence is scarce and

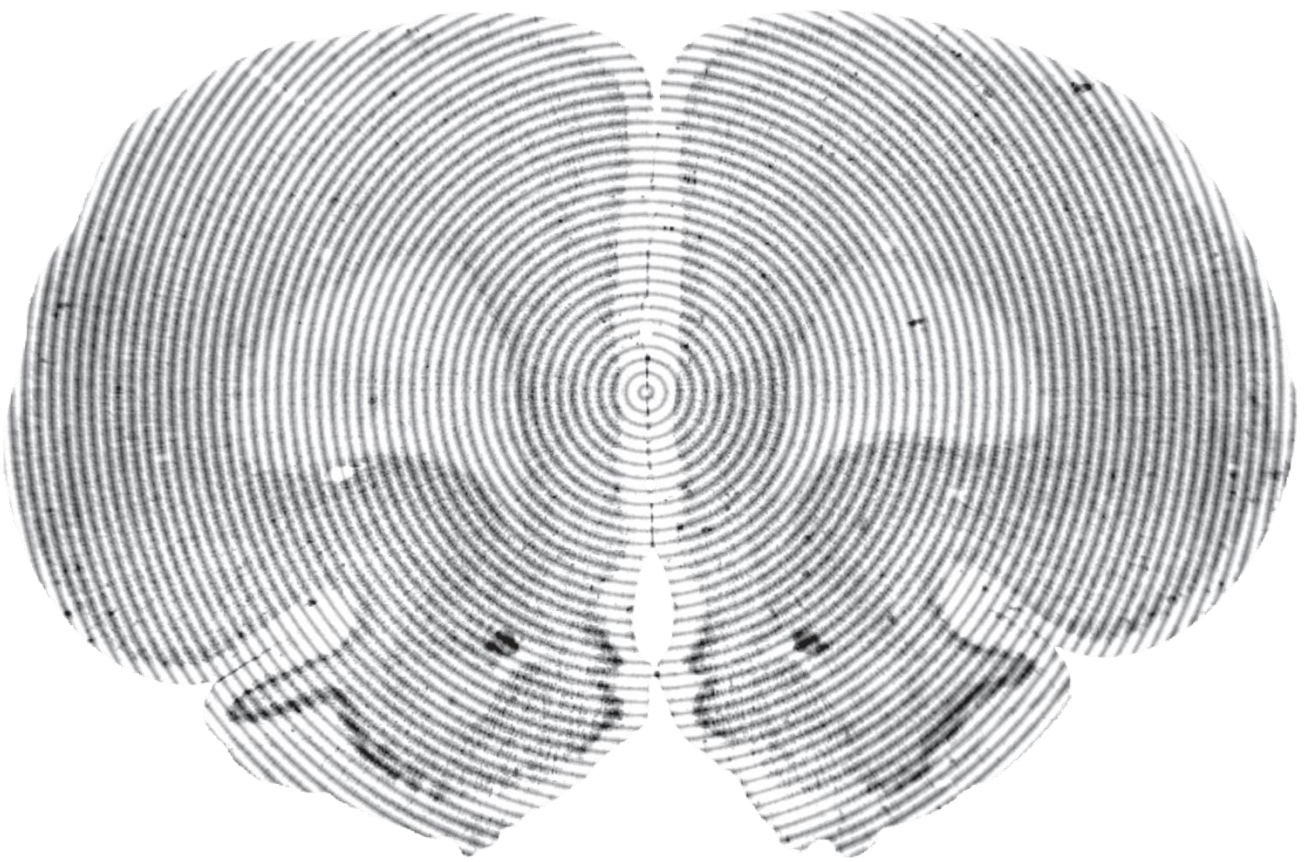
there are authors who do not find sex-dependent differences (Doremus-Fitzwater et al., 2009; Hammerslag & Gulley, 2014).

In all, our results question a simple view of novelty-seeking associated to risk-taking during adolescence as the result of the cognitive systems immaturity. On the contrary, our findings evidence a careful risk assessment based in an increased sensitivity to aversive taste stimuli which contributes to an altered decision making regulating the ingestive behavior to protect survival. This prompts an approach to study the adolescent behavior as aimed to cover the specific needs of this developmental period rather than considering it an immature and undeveloped adult behavior. Similar approaches are emerging in the field of addictive adolescent behavior (Bernheim et al., 2013).

8. Acknowledgments

Supported by the research project PSI2017-86381-P (MICINN, Spain) and BES-2015-072307 predoctoral fellowship to A. Navarro-Expósito (MECD, Spain). This research is part of the Ph.D. thesis performed by A. N. Expósito at the doctoral program in Psychology of the University of Granada.

Discusión General



Esta tesis doctoral ha expuesto, en conjunto, una serie de resultados que aportan información relevante para entender la memoria de reconocimiento gustativa con una perspectiva de desarrollo.

Para ello se ha aplicado el paradigma de AN sobre roedores adolescentes (PND28-42), adultos (PND70) y envejecidos (PND720). Esta tarea ha permitido explorar las semejanzas y diferencias en la formación de la memoria de sabores seguros con una aproximación que combina el análisis comportamental con el nivel de análisis molecular del sistema nervioso a lo largo de estas etapas de la vida.

Esta aproximación ha permitido abordar el estudio de la mPFC y vislumbrar el papel que cumple dentro de la compleja circuitería neuronal subyacente a la respuesta ante estímulos gustativos novedosos y su conformación como familiares, dos características necesarias para la formación de este tipo de memoria.

En el tercer capítulo se explora, mediante la técnica de inmunohistoquímica del marcaje de la proteína del gen de expresión temprana c-fos, el papel de dos subdivisiones de la mPFC, una región dorsal y otra ventral, a la vez que una subdivisión más convencional que incluye la ACC, PrL, IL y PD. Estas porciones de la mPFC son estudiadas tanto en ratas adultas como en ratas envejecidas.

Los hallazgos obtenidos en este estudio muestran cambios en la actividad de la mPFC asociados con la memoria de reconocimiento de sabores, y dicha actividad se modifica en función de la edad. Destacan varios resultados. Primero, usando la subdivisión dmPFC y vmPFC los resultados indican que, en la vmPFC, pero no la dmPFC, aumenta la expresión de c-Fos durante la segunda presentación del sabor frente a la primera y sexta presentación en ratas adultas. Este resultado apoya la participación de la vmPFC en la formación de la memoria de sabores seguros, pero no en la inicial respuesta neofóbica ni en el mantenimiento a largo plazo de esta memoria. Segundo, la segunda división propuesta de la mPFC muestra el mismo patrón de actividad en PrL, IL y DP. Hasta dónde llega nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que involucra la DP en la formación de memoria de sabores seguros. Un tercer hallazgo muestra que, en ratas envejecidas, a diferencia de lo que ocurre en PrL e IL que únicamente muestran una tendencia no significativa similar a la de adultos a reducir su actividad en la sexta presentación del sabor, la actividad de DP resulta más afectada por el envejecimiento. Efectivamente, la actividad de DP muestra un incremento asociado a la novedad del sabor seguido por un decremento en su actividad cuando se vuelve ligeramente familiar que se convierte en un drástico decremento cuando el proceso de familiaridad se ha consolidado.

Los resultados conductuales de este capítulo muestran cómo la respuesta a la novedad se mantiene intacta en ratas envejecidas que exhiben una respuesta neofóbica igual a la de ratas adultas. Sin embargo, las ratas envejecidas muestran un retraso en la atenuación de la neofobia, necesitando más exposiciones al sabor que las adultas, que logran atenuar en una única exposición.

El estudio del cuarto capítulo fue diseñado para evaluar la neofobia al sabor y los procesos de memoria relacionados en ratas adolescentes utilizando los mismos procedimientos aplicados en ratas adultas. Para ello se llevaron a cabo 4 experimentos. En el primero se compara la ejecución de ratas adolescentes y adultas en una tarea de AN con una solución de vinagre. Para evaluar el efecto potencial de la palatabilidad del sabor, en el experimento 2 se aplica una tarea de AN con una solución dulce no calórica de sacarina sódica. Adicionalmente para evaluar los efectos potenciales de una posible inmadurez de los procesos de memoria se realiza una tarea de inhibición latente y una tarea de elección en el experimento 3 así como una tarea de NOR en el experimento 4. En toda la serie experimental se examina también el efecto del sexo.

Los resultados del experimento 1 muestran una respuesta neofóbica en ambos grupos, adolescentes y adultos, ante un nuevo sabor. A pesar de este resultado el índice de ingesta del sabor muestra un mayor

consumo por parte de las ratas adolescentes. Ello puede interpretarse como una menor respuesta neofóbica, aunque estas, por otro lado, necesitan de más exposiciones al sabor para mostrar AN, lo que sugiere una neofobia al sabor incrementada. Mientras las adultas aumentan significativamente su consumo con una sola exposición al sabor, las ratas adolescentes necesitan de dos. Los resultados del experimento 2 confirman la respuesta neofóbica a la solución dulce de sacarina en adolescentes y adultas, evidenciada por el incremento del consumo a medida que el sabor se vuelve familiar. En ambos grupos de edad sólo se necesita una exposición a la solución de sacarina para atenuar la respuesta neofóbica. Esto indica que no existen diferencias en la intensidad de la neofobia al sabor cuando se utilizan soluciones palatables. Acorde con los resultados del experimento 3, las ratas adolescentes no muestran alteraciones de la memoria de sabores necesaria para que se ponga de manifiesto el fenómeno de inhibición latente de una aversión gustativa condicionada que es evidente en ambos grupos de edad. Las ratas adolescentes y adultas preexpuestas al sabor muestran menor aversión a la solución de sacarina que las no preexpuestas, lo que indica que recuerdan los sabores probados previamente durante la preexposición y la ausencia de consecuencias.

En relación con los resultados del experimento 4, ambos grupos de edad ejecutan de forma similar la tarea de NOR, explorando más el objeto desconocido, aunque las adolescentes muestran una mayor actividad exploratoria general que las ratas adultas. Así, la aplicación de una perspectiva del desarrollo ha permitido hallar variaciones conductuales en AN entre ratas adolescentes y adultas, que no parecen estar relacionadas con problemas de memoria derivados de la maduración cerebral, sino con una mayor sensibilidad a las propiedades estresantes de estímulos gustativos con connotaciones aversivas.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la mPFC podría participar en la memoria de reconocimiento de sabores. Es de destacar especialmente el impacto que el envejecimiento parece ejercer selectivamente sobre la DP, una región prefrontal que no se había relacionado previamente con estos procesos.

Los resultados de esta tesis doctoral muestran que el empleo de dos clasificaciones diferentes de mPFC permite extraer conclusiones más precisas sobre el rol de las diferentes regiones de la mPFC en la memoria de reconocimiento gustativo. Usando una división dorso-ventral nuestros resultados indican la participación de la vmPFC en la formación de la memoria de sabores seguros, datos confirmados por un análisis más preciso usando una clasificación más restrictiva que incluye PrL e IL, dos

de las estructuras más frecuentemente aplicadas en estudios de memoria junto a ACC y DP. Efectivamente, el patrón de actividad encontrado en la mPFC (PrL, Il) es similar al encontrado en estudios anteriores en NAcb Sh (Grau-Perales et al., 2019a). En este sentido, ha sido propuesta una interacción relevante para la familiarización de estímulos novedosos entre NAcb Sh y mPFC (Bimpisidis et al., 2013). Estos autores proponen, al igual que nosotros, que la vmPFC codificaría el valor motivacional general del sabor pero que su papel estaría limitado al cambio de este valor motivacional ya que su actividad decae cuando el sabor se establece como seguro y familiar. En concordancia con estos datos, estudios previos relacionan la actividad de PrL e Il, asociado con un incremento en la expresión c-Fos, con la extinción de CTA (Mickley et al., 2005). Además, el bloqueo de la síntesis de proteínas mediante anisomicina en vmPFC provoca también un deterioro en la extinción de CTA (Akirav et al., 2006), apoyando el rol de la zona ventral de mPFC en la flexibilidad comportamental necesaria en los procesos de extinción (Heidbreder & Groenewegen, 2003).

Por el contrario ACC no muestra un patrón de actividad distinto a lo largo del proceso de familiarización, manteniéndose la expresión de c-Fos estable durante las exposiciones al sabor, lo cual concuerda con estudios previos que muestran que las neuronas de esta área dorsal de la

mPFC controlan funciones diferentes en comparación con otras de sus subregiones (Heidbreder & Groenewegen, 2003).

En cuanto a la DP, aún es escasa la investigación en torno a esta área. Algunos estudios han arrojado luz sobre la relación neuroanatómica de esta área con PrL e IL (Heidbreder & Groenewegen, 2003), demostrando la existencia de proyecciones relevantes con el circuito de recompensa mediadas por aferentes glutamatergicas con el área tegmental ventral (Geisler et al., 2007). También se ha descrito que tanto DP como IL comparten fuertes conexiones con NAcb Sh. Sin embargo, los hallazgos de nuestro estudio contradicen las conclusiones obtenidas en otras investigaciones en las que no se detectan diferencias sustanciales entre DP e IL (Peters et al., 2008) y proponen que ambas regiones son la misma estructura. La comparación entre la actividad de la zona en ratas adultas y envejecidas arroja información crítica para aclarar esta cuestión.

Nuestros resultados indican que mientras las ratas envejecidas exhiben una tendencia no significativa a mostrar actividad reducida en PrL e IL en el grupo Familiar II, el patrón es completamente distinto en DP. Las ratas envejecidas exhiben un incremento en la actividad de DP asociado a la novedad al sabor en comparación con las ratas adultas, que es seguido por un decaimiento progresivo de la actividad de esta zona a

medida que el sabor se convierte en familiar, siendo drásticamente reducido en el grupo Familiar II. Se trata de un efecto selectivamente hallado en DP que no aparece en otras regiones tales como ACC. El patrón propio de esta región, que no muestra alteraciones de su actividad a lo largo del proceso de familiarización, es evidente tanto en ratas adultas como en ratas envejecidas. La disociación entre los patrones de actividad encontrados en IL y DP permite proponer una disociación funcional a pesar de compartir conexiones.

Por otro lado, el patrón encontrado en DP es opuesto al descrito previamente en la PrH de ratas envejecidas. Estas muestran una reducida expresión de c-Fos durante la primera exposición a vinagre pero un incremento significativo en la sexta exposición en comparación con ratas adultas (Gómez-Chacón et al., 2015). Esto podría sugerir una relación inhibitoria recíproca entre ambas áreas cerebrales durante la neofobia al sabor y la atenuación de la neofobia. Podría proponerse que la reducción de la actividad de PrH inducida por la edad podría incrementar la actividad en DP y viceversa. Además este patrón de actividad de DP en ratas envejecidas es también opuesto a aquel mostrado en el NAcb Sh (Grau-Perales, Gómez-Chacón, & Gallo, 2019), apoyando una modulación recíproca entre ambas áreas. Un mayor énfasis en el estudio de la DP podría producir resultados interesantes que pongan de manifiesto el

verdadero papel de DP como estructura funcionalmente distinta a otras áreas de la mPFC. Por esto se requiere más investigación en el circuito neuroanatómico propuesto como mediador de la neofobia y su atenuación que incluye otras áreas como PrH, AMY, IC y NAc.

En conjunto, el hecho de que el envejecimiento modifique la función de DP y cambie el nivel de actividad de PrL e IL durante una prueba de AN sugiere que la memoria de reconocimiento representa un buen modelo para explorar los cambios asociados a la edad avanzada.

Con respecto a la adolescencia, estudios en humanos adolescentes muestran una hipersensibilidad a soluciones saladas aversivas (Galvan & McGlennen, 2013). Esto puede relacionarse con el retraso en la atenuación de la neofobia a una solución ácida de vinagre que hemos encontrado, lo cual podría sugerir una mayor neofobia a la solución de vinagre que a la solución dulce de sacarina en adolescentes, reflejando una mayor sensibilidad a las propiedades palatables aversivas en comparación con adultos. Estos resultados van más allá de los descritos previamente por otros autores que han sido interpretados en el sentido de que los adolescentes son más reactivos ante estímulos reforzantes naturales pero menos sensibles a sus consecuencias negativas (Doremus-Fitzwater et al., 2010). Por el contrario, el hecho de que en los adolescentes el valor de la palatabilidad pueda incrementar la respuesta

neofóbica a sabores potencialmente peligrosos podría ser adaptativo y favorecer la supervivencia ante posibles comestibles perjudiciales para el organismo. Este incremento en la respuesta a neofóbica a una solución ácida de vinagre desconocida evidencia una mayor reactividad ante estímulos estresantes durante la exploración de un entorno novedoso.

En este sentido, el experimento 2 muestra un incremento en el consumo de soluciones palatables dulces no calóricas sin que existan diferencias en la respuesta neofóbica entre ratas adolescentes y adultas. Además, estas últimas, muestran incluso un mayor consumo que las adolescentes de la solución de sacarina a lo largo de las sucesivas exposiciones en la prueba de AN. Estos resultados no concuerdan con informes previos de Wilmouth y Spear (2009) que encontraron una mayor respuesta orofacial positiva a una solución dulce de azúcar en ratas adolescentes. Ello se ha interpretado en el sentido de que la palatabilidad al sabor dulce del azúcar se encuentra incrementada en adolescentes. Esta conclusión ha sido apoyada por el estudio de Vaidya et al. (2004) que encontraron en ratas adolescentes, en comparación con ratas adultas, un incremento en el consumo de una solución desconocida de sacarosa al 6% durante sesiones de consumo de 4 horas. Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los hallados por Dannenhoffer y Spear (2016) que no encontraron diferencias entre ratas adolescentes y

adultas en la respuesta neofóbica a una solución dulce compuesta de sacarosa (3%) y sacarina (0,125%). Como vemos, la información existente sobre la respuesta neofóbica adolescente a los sabores se ha obtenido empleando soluciones calóricas novedosas y los resultados, aunque predominan los que demuestran menor neofobia que en adultos (Vaidya et al., 2004; Wilmoth & Spear, 2009), no siempre van en la misma dirección (Dannenhoffer & Spear, 2016). La interpretación que ha predominado hasta el momento de estos datos contradictorios apoya una neofobia reducida durante la adolescencia. Sin embargo, dado que las soluciones utilizadas tenían un componente nutritivo no se debe excluir la posibilidad de que se deba a las propiedades calóricas reforzantes de la solución azucarada. Esta posible explicación se apoya en diferentes estudios que encuentran preferencias por soluciones dulces calóricas por parte de ratas adolescentes (Friemel et al., 2010; Vaidya et al., 2004; Wilmoth & Spear, 2009). Es posible que los resultados de estos estudios puedan ser interpretados como una sensibilidad incrementada durante la adolescencia a las propiedades apetitivas de estímulos gustativos calóricos que funcionan como recompensas naturales. Durante el período de la adolescencia la necesidad de un aporte calórico que permita el rápido crecimiento típico de esta etapa está bien descrito (Nance, 1983), siendo el estadio de la vida en el que se encuentra una mayor ingesta de

nutrientes respecto a otras etapas. Por ello no es de extrañar que nuestros experimentos con soluciones gustativas no calóricas arrojen resultados diferentes. En nuestros experimentos no se encuentran diferencias entre las respuestas neofóbicas de adolescentes y adultos usando soluciones dulces sin aporte nutritivo, y por ello, sin un componente apetitivo reforzante adicional al mero consumo de líquidos en animales sometidos a un programa de privación de agua.,

Sorprendentemente, la ingesta reducida de sabores novedosos parece ir en contra de la búsqueda de la novedad que caracteriza el comportamiento adolescente. De todas formas, usualmente los estudios que tratan esta característica trabajan con tareas que implican la exploración de claves externas del entorno, como lugares (Lundberg et al., 2019; Stansfield & Kirstein, 2006) u objetos novedosos (Douglas et al., 2003; Ramsaran et al., 2016) que además vienen acompañados de un incremento de la respuesta al estrés (Doremus-Fitzwater et al., 2010; Lundberg et al., 2019). A diferencia de los estímulos exteroceptivos cuyas consecuencias son inmediatas, los estímulos interoceptivos asociados a la ingestión de comestibles, tales como los gustativos, van acompañados de efectos interoceptivos viscerales demorados en el tiempo ya que requieren procesos de digestión y absorción. Por lo que el mantenimiento de la respuesta neofóbica durante más exposiciones al

sabor en adolescentes que en adultos que hemos hallado en nuestros experimentos puede interpretarse como un incremento en la exploración cautelosa de sabores en ratas adolescentes. Desde este punto de vista, los datos expuestos concuerdan con la conducta de búsqueda de la novedad durante la adolescencia descrita en tareas exteroceptivas que describen exploración reducida de las áreas centrales del campo abierto desconocido. No obstante, nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de continuar investigando las peculiaridades de la exploración de claves interoceptivas en el contexto de los cambios comportamentales durante el desarrollo.

Hasta la fecha, los estudios en ratas adolescentes han constituido un buen modelo de estudio comportamental durante el desarrollo. Para esto ha sido necesario identificar las concomitancias de este período entre humanos y otras especies. En concreto, en la rata se han seguido una serie de criterios conservadores para establecer la adolescencia desde el PND28 al PND42 basado en conductas de transición como el juego, el comportamiento exploratorio o la interacción social (Spear, 2000). Dependiendo del estudio, estos márgenes varían ligeramente, desde los más restrictivos (PND28 a PND34) (Philpot & Wecker, 2008) a algunos más amplios que extienden la adolescencia hasta el PND 60 (Arenas et al., 2016). En nuestro estudio, el rango de edad establecido

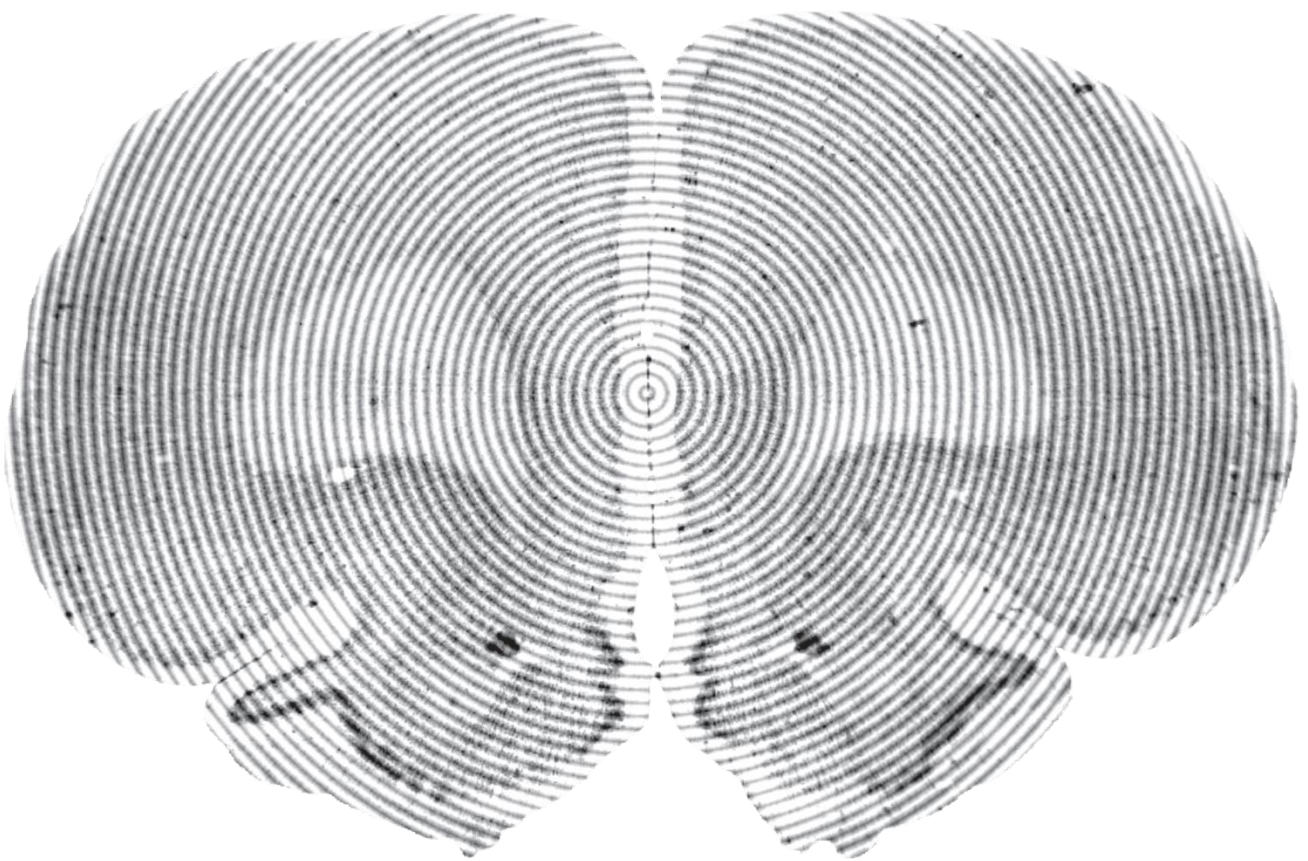
corresponde a una adolescencia media (PN28 a PN42) considerada como la adolescencia más prototípica (Varlinskaya & Spear, 2006) con la intención de asegurarnos de estudiar exclusivamente el período adolescente.

Adicionalmente, en el capítulo 4 exploramos el efecto del sexo utilizando ratas macho y hembra en todas las tareas utilizadas. Los resultados no mostraron efecto del sexo en ninguna de estas tareas. Aunque la evidencia es escasa, los resultados previamente descritos en otras investigaciones no son concluyentes ya que algunos investigadores encuentran un mayor impacto de la adolescencia en machos para tareas de exploración de objetos novedosos (Douglas et al., 2003), en la respuesta al estrés inducida por los brazos descubiertos del laberinto en cruz elevado (Lynn & Brown, 2010) o el consumo de alcohol (Vetter-O'Hagen et al., 2009) mientras que otros autores no encuentran este efecto en sus trabajos (Doremus-Fitzwater et al., 2009; Hammerslag & Gulley, 2014). Sería deseable indagar en los posibles efectos del sexo en esta etapa madurativa en futuras investigaciones.

En conjunto, en el presente trabajo se ha analizado el papel de la memoria de reconocimiento de sabores con una aproximación de desarrollo, además de explorar el posible papel de las distintas subregiones de la

mPFC en el modelo de memoria de reconocimiento de sabores que representa la atenuación de la neofobia.

Conclusiones



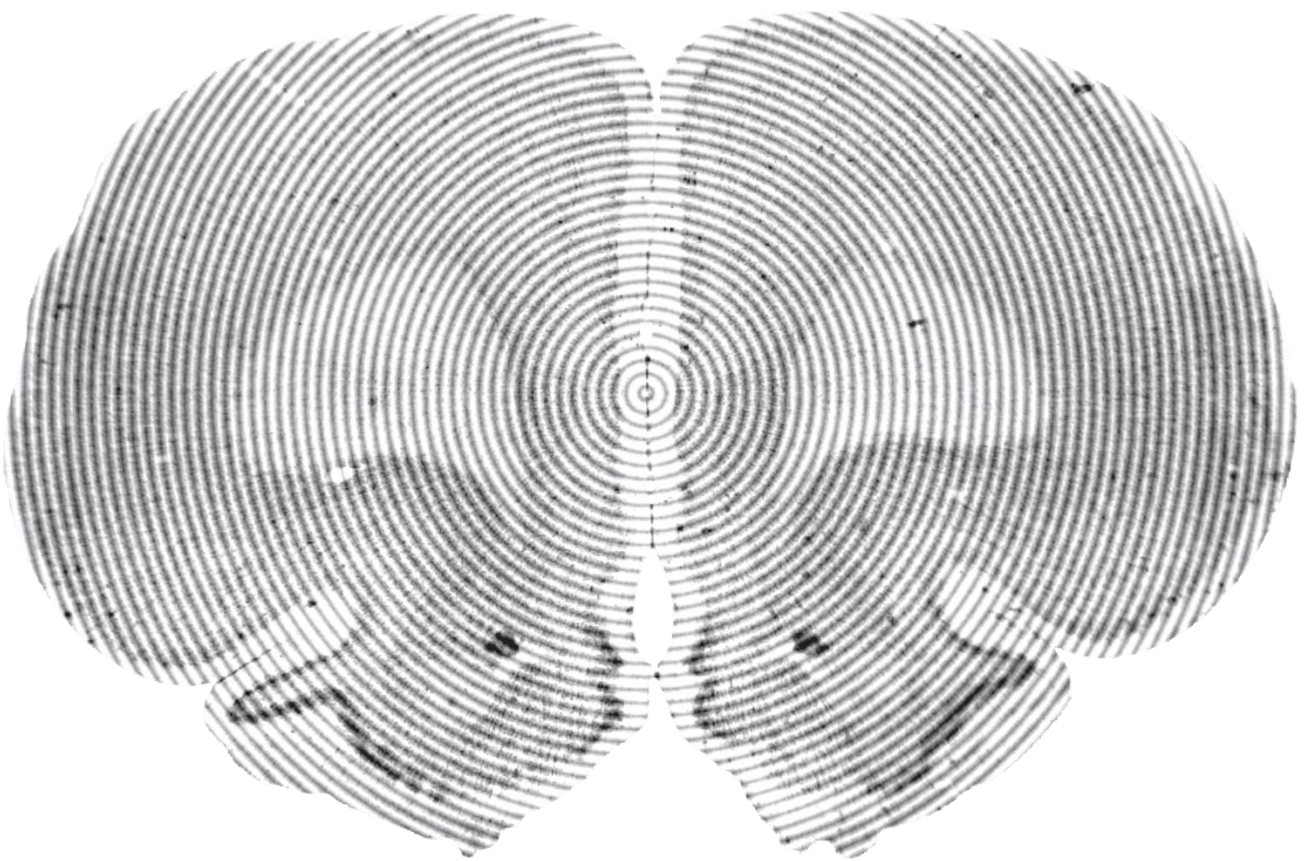
1. La corteza prefrontal medial cumple un papel en la formación de la memoria de sabores seguros durante las primeras etapas de la tarea de atenuación de la neofobia gustativa.
2. Existe una distinción funcional en el eje dorso-ventral de la corteza prefrontal medial siendo la región ventral la implicada en la formación de la memoria de sabores seguros.
3. La actividad de las subregiones prelímbica, infralímbica y peduncular dorsal de la corteza prefrontal medial se ve incrementada durante la segunda presentación del sabor novedoso en ratas adultas, participando en las primeras etapas de la formación de la memoria de sabores seguros.
4. El envejecimiento está asociado a un déficit en memoria de reconocimiento gustativo, ya que requiere mayor número de presentaciones para que el sabor se convierta en familiar.
5. La actividad de las cortezas prelímbica e infralímbica está sujeta a cambios relacionados con el envejecimiento observándose un

6. decremento en su actividad, pero manteniendo un patrón similar al de ratas adultas.
7. El patrón de actividad de la corteza peduncular dorsal sufre un cambio drástico en ratas envejecidas con una mayor actividad ante la primera presentación del sabor novedoso que se reduce exponencialmente a medida que el sabor se convierte en familiar.
8. No hay diferencias en la respuesta neofóbica a una solución ácida de vinagre entre ratas adolescentes y adultas. Sin embargo, las ratas adolescentes necesitan un mayor número de exposiciones para atenuar la respuesta neofóbica a una solución ácida de vinagre que las ratas adultas. Durante la adolescencia existe mayor sensibilidad a las posibles propiedades estresantes de estímulos gustativos menos palatables, como es el caso del vinagre. Este resultado evidencia una evaluación cautelosa de los riesgos en esta etapa madurativa.
9. No hay diferencias en la respuesta neofóbica a una solución dulce no calórica entre ratas adolescentes y adultas. En ambos grupos de edad se atenúa la respuesta neofóbica al sabor tras una sola exposición. En contraste con el retraso encontrado en la atenuación de la neofobia a

una solución ácida de vinagre en ratas adolescentes, no existen diferencias entre ratas adolescentes y adultas cuando se presenta una solución palatable. Ello podría interpretarse como una distinta sensibilidad a las propiedades apetitivas de estímulos recompensantes naturales frente a estímulos menos recompensantes como el sabor ácido del vinagre durante la adolescencia.

10. El retraso en la formación de la memoria gustativa segura propio de la adolescencia no se puede atribuir a déficits de memoria inespecíficos puesto que las ratas adolescentes muestran una ejecución similar a la de ratas adultas en tareas de inhibición latente y reconocimiento de objetos novedosos.

Conclusions



1. Medial Prefrontal Cortex appears to play a role in the formation of safe taste memory during the early stages of taste neophobia attenuation.
2. There is a functional dissociation in the dorso-ventral axis of the medial Prefrontal Cortex being the ventral region, but not the dorsal, involved in safe taste memory formation.
3. The activity of the medial Prefrontal Cortex subregions Prelimbic, Infralimbic and Dorsal Peduncular is increased during the second presentation of the novel taste in adults, thus participating in the early stages of the safe taste memory formation.
4. Aging is associated with a safe taste memory formation deficit, since it requires a greater number of presentations so that the taste becomes familiar.
5. Prelimbic e Infralimbic activity suffer age-related change consisting in an activity decrement but a similar activity pattern in comparison with adults.
6. Dorsal Peduncular Cortex activity pattern undergoes a drastic change associated with aging as it shows greater activity during the first

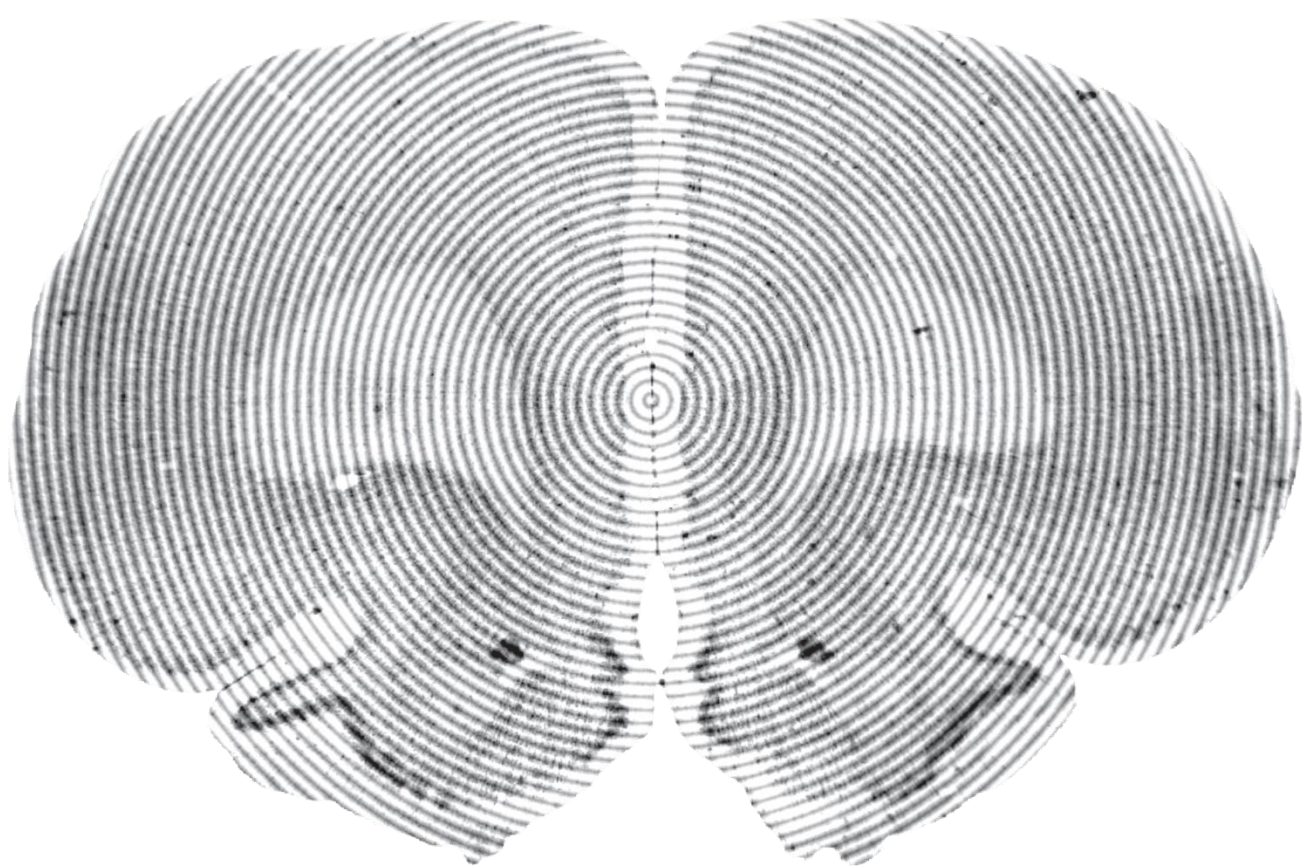
presentation of the novel taste which is exponentially reduced as the taste becomes familiar.

7. There are no differences in the neophobic response to an acid vinegar solution between adolescent and adult rats. However, adolescent rats require a greater number of exposures than adults to attenuate the neophobic response to the acid vinegar solution. During adolescence there is a greater sensitivity to the potential stressful properties of less palatable taste stimuli, as in the case of vinegar. This result evidences a cautious evaluation of the risks in this developmental stage.

8. There are no differences in the neophobic response to a non-caloric sweet solution between adolescent and adult rats. In both age groups, the neophobic response to taste is attenuated after a single exposure. This indicates that there is no difference in the intensity of taste neophobia when a palatable solution is presented. In contrast to the delay found in adolescent rats in the attenuation of neophobia to a less palatable acid vinegar solution, there is no differences between adolescent and adult rats when a palatable solution is applied. This could be interpreted as a different sensitivity to the appetitive properties of natural rewarding stimuli versus less rewarding stimuli such as acid taste of vinegar during adolescence.

9. The delayed formation of the safe taste memory during adolescence cannot be attributed to non-specific memory deficits since adolescent rats exhibit similar performance as adult rats in Latent Inhibition and Novel Object Recognition tasks.

Bibliografía



- Aggleton, J. P. (1985). One-trial object recognition by rats. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B*, 37(4), 279-294. <https://doi.org/10.1080/14640748508401171>
- Akhter, F., Haque, T., Sato, F., Kato, T., Ohara, H., Fujio, T., Tsutsumi, K., Uchino, K., Sessle, B. J., & Yoshida, A. (2014). Projections from the dorsal peduncular cortex to the trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) and other lower brainstem areas in rats. *Neuroscience*, 266, 23-37. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.046>
- Akirav, I., Khatsrinov, V., Vouimba, R.-M., Merhav, M., Ferreira, G., Rosenblum, K., & Maroun, M. (2006). Extinction of conditioned taste aversion depends on functional protein synthesis but not on NMDA receptor activation in the ventromedial prefrontal cortex. *Learning & Memory*, 13(3), 254-258. <https://doi.org/10.1101/lm.191706>
- Akirav, I., & Maroun, M. (2006). Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 16(12), 1759-1765. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhj114>
- Albasser, M. M., Amin, E., Iordanova, M. D., Brown, M. W., Pearce, J. M., & Aggleton, J. P. (2011). Separate but interacting recognition memory systems for different senses: The role of the rat perirhinal cortex. *Learning & Memory*, 18(7), 435-443. <https://doi.org/10.1101/lm.2132911>
- Aliani, M., Udenigwe, C. C., Girgih, A. T., Pownall, T. L., Bugera, J. L., & Eskin, M. N. A. (2013). Aroma and Taste Perceptions With Alzheimer Disease and Stroke. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 760-769. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559557>
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93-110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>

- Arenas, M., Aguilar, M. A., Montagud-Romero, S., Mateos-Garcia, A., Navarro-Frances, C. I., Minarro, J., & Rodriguez-Arias, M. (2016). Influence of the Novelty-Seeking Endophenotype on the Rewarding Effects of Psychostimulant Drugs in Animal Models. *Current Neuropharmacology*, *14*(1), 87-100.
<https://doi.org/10.2174/1570159X13666150921112841>
- Bechara, A., Damasio, H., & Damasio, A. R. (2003). Role of the Amygdala in Decision-Making. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *985*(1), 356-369.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07094.x>
- Belblidia, H., Leger, M., Abdelmalek, A., Quiedeville, A., Calocer, F., Boulouard, M., Jozet-Alves, C., Freret, T., & Schumann-Bard, P. (2018). Characterizing age-related decline of recognition memory and brain activation profile in mice. *Experimental Gerontology*, *106*, 222-231. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.03.006>
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(3), 209-217. <https://doi.org/10.1038/nrn1344>
- Bernheim, A., Halfon, O., & Boutrel, B. (2013). Controversies about the enhanced vulnerability of the adolescent brain to develop addiction. *Frontiers in Pharmacology*, *4*, 118.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00118>
- Bielavska, E., & Bures, J. (1994). Universality of parabrachial mediation of conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research*, *60*(1), 35-42. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90060-4)
- Bimpisidis, Z., Luca, M. A. D., Pisanu, A., & Chiara, G. D. (2013). Lesion of medial prefrontal dopamine terminals abolishes habituation of accumbens shell dopamine responsiveness to taste stimuli. *European Journal of Neuroscience*, *37*(4), 613-622.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12068>

- Bures, J., Buresova, O., & Ivanova, S. F. (1991). Brain stem mechanisms of conditioned taste aversion learning in rats. *Archives Internationales De Physiologie, De Biochimie Et De Biophysique*, 99(5), A131-134.
- Burešová, O., & Bureš, J. (1977). The effect of anesthesia on acquisition and extinction of conditioned taste aversion. *Behavioral Biology*, 20(1), 41-50.
[https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(77\)90473-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(77)90473-4)
- Casey, B. J., Heller, A. S., Gee, D. G., & Cohen, A. O. (2019). Development of the emotional brain. *Neuroscience Letters*, 693, 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.055>
- Cassidy, B. S., Hedden, T., Yoon, C., & Gutchess, A. H. (2014). Age differences in medial prefrontal activity for subsequent memory of truth value. *Frontiers in Psychology*, 5.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00087>
- Caynas-Rojas, S., Rodríguez-García, G., Delint-Ramírez, I., & Miranda, M. I. (2019). Differential function of medial prefrontal cortex catecholaminergic receptors after long-term sugar consumption. *Behavioural Brain Research*, 356, 495-503.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.06.009>
- Chandrashekar, J., Hoon, M., Ryba, N., & Zuker, C. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444, 288-294. <https://doi.org/10.1038/nature05401>
- Clermont, Y., & Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *American Journal of Anatomy*, 100(2), 241-267.
<https://doi.org/10.1002/aja.1001000205>
- Cohen, M. A., Horowitz, T. S., & Wolfe, J. M. (2009). Auditory recognition memory is inferior to visual recognition memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 6008-6010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811884106>
- Cruz-Sanchez, A., Dematagoda, S., Ahmed, R., Mohanathaas, S., Odenwald, N., & Arruda-Carvalho, M. (2020). Developmental onset distinguishes three types of spontaneous

- recognition memory in mice. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67619-w>
- Dannenhoffer, C. A., & Spear, L. P. (2016). Age Differences in Conditioned Place Preferences and Taste Aversions to Nicotine. *Developmental Psychobiology*, *58*(5), 660-666.
<https://doi.org/10.1002/dev.21400>
- Darmani, N. A., Shaddy, J., & Gerdes, C. F. (1996). Differential ontogenesis of three DOI-induced behaviors in mice. *Physiology & Behavior*, *60*(6), 1495-1500.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00323-X)
- de Brabander, J. M., Rj, K., & Hb, U. (1998). Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex. *The European Journal of Neuroscience*, *10*(4), 1261-1269. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00137.x>
- Dela Cruz, J. A. D., Coke, T., & Bodnar, R. J. (2016). Simultaneous Detection of c-Fos Activation from Mesolimbic and Mesocortical Dopamine Reward Sites Following Naive Sugar and Fat Ingestion in Rats. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *114*.
<https://doi.org/10.3791/53897>
- Dickstein, D. L., Weaver, C. M., Luebke, J. I., & Hof, P. R. (2013). Dendritic spine changes associated with normal aging. *Neuroscience*, *251*, 21.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.077>
- Döhler, K. D., & Wuttke, W. (1975). Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*, *97*(4), 898-907. <https://doi.org/10.1210/endo-97-4-898>
- Domjan, M., & Gillan, D. (1976). Role of novelty in the aversion for increasingly concentrated saccharin solutions. *Physiology & Behavior*, *16*(5), 537-542.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(76\)90211-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(76)90211-0)

- Doremus-Fitzwater, T. L., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2009). Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiology & Behavior*, *97*(3-4), 484-494. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.025>
- Doremus-Fitzwater, T. L., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2010). Motivational systems in adolescence: Possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain and Cognition*, *72*(1), 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2009.08.008>
- Douglas, L. A., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2003). Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: Effects of social isolation. *Physiology & Behavior*, *80*(2-3), 317-325. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2003.08.003>
- Driscoll, I., Davatzikos, C., An, Y., Wu, X., Shen, D., Kraut, M., & Resnick, S. M. (2009). Longitudinal pattern of regional brain volume change differentiates normal aging from MCI. *Neurology*, *72*(22), 1906-1913. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181a82634>
- Dumitriu, D., Hao, J., Hara, Y., Kaufmann, J., Janssen, W. G. M., Lou, W., Rapp, P. R., & Morrison, J. H. (2010). Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(22), 7507-7515. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6410-09.2010>
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, *31*(1), 47-59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)
- Exposito, A. N., Morillas, E., Gomez-Chacon, B., & Gallo, M. (2020). Prefrontal cortex activity patterns during taste neophobia habituation in adult and aged rats. *Behavioural Brain Research*, *392*, 112717. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112717>

- Fisk, G. D., & Wyss, J. M. (2000). Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. *Brain Research*, *859*(1), 83-95.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)01935-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)01935-1)
- Fitzgerald, R. E., & Burton, M. J. (1983). Neophobia and conditioned taste aversion deficits in the rat produced by undercutting temporal cortex. *Physiology & Behavior*, *30*(2), 203-206.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(83\)90006-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(83)90006-9)
- Fraundorf, S. H., Hourihan, K. L., Peters, R. A., & Benjamin, A. S. (2019). Aging and recognition memory: A meta-analysis. *Psychological Bulletin*, *145*(4), 339-371.
<https://doi.org/10.1037/bul0000185>
- Friemel, C. M., Spanagel, R., & Schneider, M. (2010). Reward sensitivity for a palatable food reward peaks during pubertal developmental in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *4*, 39. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00039>
- Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., Jays, P. R. L., Salway, P., & Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *Journal of Comparative Neurology*, *492*(2), 145-177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- Galef, B. (1977). *Mechanisms for the social transmission of food preferences from adult to weanling rats* (pp. 123-148).
- Gallo, M. (2018). 2—Taste neophobia over the life span. En Steve Reilly (Ed.), *Food Neophobia* (pp. 25-41). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101931-3.00002-1>
- Gallo, M., & Bures, J. (1991). Acquisition of conditioned taste aversion in rats is mediated by ipsilateral interaction of cortical and mesencephalic mechanisms. *Neuroscience Letters*, *133*(2), 187-190. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90566-C](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90566-C)
- Gallo, M., Duperón, M., Molero-Chamizo, A., & Morón, I. (1999). Taste Aversion Learning as a Tool for the Study of Hippocampal and Non-Hippocampal Brain Memory Circuits

- Regulating Diet Selection. *Nutritional Neuroscience*, 2, 277-302.
<https://doi.org/10.1080/1028415X.1999.11747284>
- Galvan, A., Hare, T. A., Parra, C. E., Penn, J., Voss, H., Glover, G., & Casey, B. J. (2006). Earlier Development of the Accumbens Relative to Orbitofrontal Cortex Might Underlie Risk-Taking Behavior in Adolescents. *Journal of Neuroscience*, 26(25), 6885-6892.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1062-06.2006>
- Galvan, A., & McClennen, K. M. (2013). Enhanced Striatal Sensitivity to Aversive Reinforcement in Adolescents versus Adults. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 25(2), 284-296.
https://doi.org/10.1162/jocn_a_00326
- Gámiz, F., & Gallo, M. (2011). Taste Learning and Memory: A Window on the Study of Brain Aging. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00091>
- Gámiz, F., & Gallo, M. (2012). Spontaneous object recognition memory in aged rats: Complexity versus similarity. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 19, 444-448.
<https://doi.org/10.1101/lm.027003.112>
- Geisler, S., Derst, C., Veh, R. W., & Zahm, D. S. (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(21), 5730-5743. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0012-07.2007>
- Ghashghaei, H. T., & Barbas, H. (2002). Pathways for emotion: Interactions of prefrontal and anterior temporal pathways in the amygdala of the rhesus monkey. *Neuroscience*, 115(4), 1261-1279. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00446-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00446-3)
- Giedd, J. N. (2004). Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1021, 77-85. <https://doi.org/10.1196/annals.1308.009>
- Gómez-Chacón, B., Gamiz, F., Foster, T. C., & Gallo, M. (2016). Increased N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Expression in Amygdala and Perirhinal Cortex during Habituation of Taste Neophobia. *Neural Plasticity*, 2016, 2726745.
<https://doi.org/10.1155/2016/2726745>

- Gómez-Chacón, B., Gamiz, F., & Gallo, M. (2012). Basolateral amygdala lesions attenuate safe taste memory-related c-fos expression in the rat perirhinal cortex. *Behavioural Brain Research*, 230(2), 418-422. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.038>
- Gómez-Chacón, B., Morillas, E., & Gallo, M. (2015). Altered perirhinal cortex activity patterns during taste neophobia and their habituation in aged rats. *Behavioural Brain Research*, 281, 245-249. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.020>
- Gonzalez, M. C., Villar, M. E., Igaz, L. M., Viola, H., & Medina, J. H. (2015). Dorsal medial prefrontal cortex contributes to conditioned taste aversion memory consolidation and retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 126, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.10.007>
- Grau-Perales, A., & Gallo, M. (2020). The auditory context-dependent attenuation of taste neophobia depends on D1 dopamine receptor activity in mice. *Behavioural Brain Research*, 391, 112687. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112687>
- Grau-Perales, A., Gómez-Chacón, B., & Gallo, M. (2019). Differential activity pattern of c-Fos in the nucleus accumbens between adult and aged rats during flavor recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 371, 111935. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111935>
- Grau-Perales, A., Gómez-Chacon, B., Morillas, E., & Gallo, M. (2019). Flavor recognition memory related activity of the posterior piriform cortex in adult and aged rats. *Behavioural Brain Research*, 360, 196-201. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.12.016>
- Greenhouse, S. W., & Geisser, S. (1959). On methods in the analysis of profile data. *Psychometrika*, 24, 95-112. <https://doi.org/10.1007/BF02289823>
- Grill, H. J., & Norgren, R. (1978). Chronically decerebrate rats demonstrate satiation but not bait shyness. *Science (New York, N.Y.)*, 201(4352), 267-269. <https://doi.org/10.1126/science.663655>
- Gutiérrez, R., Rodríguez-Ortiz, C. J., De La Cruz, V., Núñez-Jaramillo, L., & Bermudez-Rattoni, F. (2003). Cholinergic dependence of taste memory formation: Evidence of two distinct

- processes. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(3), 323-331.
[https://doi.org/10.1016/s1074-7427\(03\)00066-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7427(03)00066-2)
- Hamezah, H. S., Durani, L. W., Ibrahim, N. F., Yanagisawa, D., Kato, T., Shiino, A., Tanaka, S., Damanhuri, H. A., Ngah, W. Z. W., & Tooyama, I. (2017). Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions. *Experimental Gerontology*, 99, 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.09.008>
- Hammerslag, L. R., & Gulley, J. M. (2014). Age and Sex Differences in Reward Behavior in Adolescent and Adult Rats. *Developmental psychobiology*, 56(4), 611-621.
<https://doi.org/10.1002/dev.21127>
- Heidbreder, C. A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(6), 555-579.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.09.003>
- Henriques, A. S., King, S. C., & Meiselman, H. L. (2009). Consumer segmentation based on food neophobia and its application to product development. *Food Quality and Preference*, 20(2), 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2008.01.003>
- Haupt, T. A., Philopena, J. M., Wessel, T. C., Joh, T. H., & Smith, G. P. (1994). Increased c-fos expression in nucleus of the solitary tract correlated with conditioned taste aversion to sucrose in rats. *Neuroscience Letters*, 172(1), 1-5. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90648-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90648-3)
- Inui-Yamamoto, C., Yamamoto, T., Ueda, K., Nakatsuka, M., Kumabe, S., Inui, T., & Iwai, Y. (2017). Taste preference changes throughout different life stages in male rats. *PloS One*, 12(7), e0181650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181650>
- Ivanova, S. F., & Bureš, J. (1990). Conditioned taste aversion is disrupted by prolonged retrograde effects of intracerebral injection of tetrodotoxin in rats. *Behavioral Neuroscience*, 104(6), 948-954. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.104.6.948>

- Juraska, J. M., & Lowry, N. C. (2012). Neuroanatomical Changes Associated with Cognitive Aging. In M.-C. Pardon & M. W. Bondi (Eds.), *Behavioral Neurobiology of Aging* (pp. 137-162). Springer. https://doi.org/10.1007/7854_2011_137
- Kaczorowski, C. C., Davis, S. J., & Moyer, J. R. (2012). Aging redistributes medial prefrontal neuronal excitability and impedes extinction of trace fear conditioning. *Neurobiology of Aging*, *33*(8), 1744-1757. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.020>
- Kafkas, A., & Montaldi, D. (2018). How do memory systems detect and respond to novelty? *Neuroscience Letters*, *680*, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.01.053>
- Kang, S., Cox, C. L., & Gulley, J. M. (2018). High frequency stimulation-induced plasticity in the prelimbic cortex of rats emerges during adolescent development and is associated with an increase in dopamine receptor function. *Neuropharmacology*, *141*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.037>
- Kehoe, P., & Blass, E. M. (1986). Conditioned aversions and their memories in 5-day-old rats during suckling. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *12*(1), 40-47. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.12.1.40>
- Kelley, A. E. (2004). Memory and Addiction: Shared Neural Circuitry and Molecular Mechanisms. *Neuron*, *44*(1), 161-179. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.016>
- Kellogg, C. K., Awatramani, G. B., & Piekut, D. T. (1998). Adolescent development alters stressor-induced Fos immunoreactivity in rat brain. *Neuroscience*, *83*(3), 681-689. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00408-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00408-9)
- Kesner, R. P., & Churchwell, J. C. (2011). An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiology of Learning and Memory*, *96*(3), 417-431. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.07.002>
- Klebaur, J. E., Bevins, R. A., Segar, T. M., & Bardo, M. T. (2001). Individual differences in behavioral responses to novelty and amphetamine self-administration in male and

- female rats. *Behavioural Pharmacology*, 12(4), 267-275.
<https://doi.org/10.1097/00008877-200107000-00005>
- Kolb, B., & Tees, R. C. (1990). *The cerebral cortex of the rat* (pp. xii, 645). The MIT Press.
- Kristie H, S., & Cheryl L, K. (2006). Effects of novelty on behavior in the adolescent and adult rat. *Developmental Psychobiology*, 48(1), 10-15. <https://doi.org/10.1002/dev.20127>
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23(1), 155-184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>
- Lin, J.-Y., & Reilly, S. (2012). Amygdala–gustatory insular cortex connections and taste neophobia. *Behavioural Brain Research*, 235(2), 182-188.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.040>
- Lin, J.-Y., Roman, C., St Andre, J., & Reilly, S. (2009). Taste, olfactory and trigeminal neophobia in rats with forebrain lesions. *Brain Research*, 1251, 195-203.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.11.040>
- Lubow, R. E. (1973). Latent Inhibition. *Psychological Bulletin*, 79(6), 398-407.
<https://doi.org/10.1037/h0034425>
- Lubow, R. E., & Weiner, I. (Eds.). (2010). *Latent Inhibition: Cognition, Neuroscience and Applications to Schizophrenia*. Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511730184>
- Lundberg, S., Hogman, C., & Roman, E. (2019). Adolescent Exploratory Strategies and Behavioral Types in the Multivariate Concentric Square Field (TM) Test. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 41. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00041>
- Lynn, D. A., & Brown, G. R. (2010). The ontogeny of anxiety-like behavior in rats from adolescence to adulthood. *Developmental Psychobiology*, 52(8), 731-739.
<https://doi.org/10.1002/dev.20468>

- Macrì, S., Adriani, W., Chiarotti, F., & Laviola, G. (2002). Risk taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Animal Behaviour*, *64*(4), 541-546. <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.4004>
- Mahoney, J. R., Li, P. C. C., Oh-Park, M., Verghese, J., & Holtzer, R. (2011). Multisensory integration across the senses in young and old adults. *Brain Research*, *1426*, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.09.017>
- Malkusz, D. C., Banakos, T., Mohamed, A., Vongwattanakit, T., Malkusz, G., Saeed, S., Martinez, S., Bohn, T., Mahmud, F., Liss, C., Rozvi, A., Touzani, K., Sciafani, A., & Bodnar, R. J. (2012). Dopamine signaling in the medial prefrontal cortex and amygdala is required for the acquisition of fructose-conditioned flavor preferences in rats. *Behavioural Brain Research*, *233*(2), 500-507. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.004>
- Manrique, T., Gámiz, F., Morón, I., Ballesteros, M. A., & Gallo, M. (2009). Peculiar modulation of taste aversion learning by the time of day in developing rats. *Developmental Psychobiology*, *51*(2), 147-157. <https://doi.org/10.1002/dev.20354>
- Maroun, M., Kavushansky, A., Holmes, A., Wellman, C., & Motanis, H. (2012). Enhanced Extinction of Aversive Memories by High-Frequency Stimulation of the Rat Infralimbic Cortex. *PLOS ONE*, *7*(5), e35853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035853>
- Melo, P., Magalhães, A., Alves, C. J., Tavares, M. A., de Sousa, L., Summavielle, T., & Moradas-Ferreira, P. (2012). Methamphetamine mimics the neurochemical profile of aging in rats and impairs recognition memory. *Neurotoxicology*, *33*(3), 491-499. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.03.002>
- Mickley, G. A., Hoxha, Z., Bacik, S., Kenmuir, C. L., Wellman, J. A., Biada, J. M., & DiSorbo, A. (2007). Spontaneous recovery of a conditioned taste aversion differentially alters extinction-induced changes in c-Fos protein expression in rat amygdala and neocortex. *Brain Research*, *1152*, 139-157. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.03.050>

- Mickley, G. A., Kenmuir, C. L., Yocom, A. M., Wellman, J. A., & Biada, J. M. (2005). A role for prefrontal cortex in the extinction of a conditioned taste aversion. *Brain Research, 1051*(1-2), 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.033>
- Mishkin, M., & Delacour, J. (1975). An analysis of short-term visual memory in the monkey. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, 1*(4), 326-334. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.1.4.326>
- Miller, E., & Cohen, J. (2001). An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. *Annual review of neuroscience, 24*, 167-202. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
- Morillas, E, Gomez-Chacon, B., & Gallo, M. (2017). Flavor and object recognition memory impairment induced by excitotoxic lesions of the perirhinal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory, 144*, 230-234. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.08.002>
- Morillas, E, Gomez-Chacon, B., Gámiz, F., & Gallo, M. (2014). *Gustatory thalamus and taste familiarity in rats* (p. 105).
- Morillas, Morillas, E., Gomez-Chacon, B., Gamiz, F., & Gallo, M. (2014). Gustatory thalamus and taste familiarity in rats. *CHEMICAL SENSES, 39*(1), 104–105.
- Morón, I., & Gallo, M. (2007). Effect of previous taste experiences on taste neophobia in young-adult and aged rats. *Physiology & Behavior, 90*(2), 308-317. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.09.036>
- Mota, C., Taipa, R., Neves, S., Monteiro-Martins, S., Monteiro, S., Palha, J., Sousa, N., Sousa, J., & Cerqueira, J. (2019). Structural and molecular correlates of cognitive aging in the rat. *Scientific Reports, 9*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39645-w>
- Murty, V. P., Ballard, I. C., Macduffie, K. E., Krebs, R. M., & Adcock, R. A. (2013). Hippocampal networks habituate as novelty accumulates. *Learning & Memory, 20*(4), 229-235. <https://doi.org/10.1101/lm.029728.112>

- Nance, D. M. (1983). The developmental and neural determinants of the effects of estrogen on feeding behavior in the rat: A theoretical perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 7(2), 189-211. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(83\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0149-7634(83)90015-5)
- Naor, C., & Dudai, Y. (1996). Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research*, 79(1-2), 61-67. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00262-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00262-6)
- Oliva, A. (2007). Desarrollo cerebral y asunción de riesgos durante la adolescencia. *Apuntes de Psicología*, ISSN 0213-3334, Vol. 25, Nº. 3, 2007, pags. 239-254.
- Öngür, D., & Price, J. L. (2000). The Organization of Networks within the Orbital and Medial Prefrontal Cortex of Rats, Monkeys and Humans. *Cerebral Cortex*, 10(3), 206-219. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.206>
- Osorio-Gómez, D., Guzman-Ramos, K., & Bermúdez-Rattoni, F. (2018). Neurobiology of neophobia and its attenuation. En *Food Neophobia* (pp. 111-128). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101931-3.00006-9>
- Paxinos, G., & Watson, C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney : Academic Press. <https://trove.nla.gov.au/work/8025602>
- Pedersen, P. E., & Blass, E. M. (1982). Prenatal and postnatal determinants of the 1st suckling episode in albino rats. *Developmental Psychobiology*, 15(4), 349-355. <https://doi.org/10.1002/dev.420150407>
- Pelleymounter, M. A., & Cullen, M. J. (1993). Effects of idebenone on information processing in aged Long-Evans rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 46(2), 415-421. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90373-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90373-2)
- Peters, J., LaLumiere, R. T., & Kalivas, P. W. (2008). Infralimbic prefrontal cortex is responsible for inhibiting cocaine seeking in extinguished rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(23), 6046-6053. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1045-08.2008>

- Philpot, R. M., & Wecker, L. (2008). Dependence of adolescent novelty-seeking behavior on response phenotype and effects of apparatus scaling. *Behavioral Neuroscience*, *122*(4), 861-875. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.4.861>
- Pliner, P., & Hobden, K. (1992). Development of a scale to measure the trait of food neophobia in humans. *Appetite*, *19*(2), 105-120. [https://doi.org/10.1016/0195-6663\(92\)90014-W](https://doi.org/10.1016/0195-6663(92)90014-W)
- Ramos, J. (2015). Differential contribution of perirhinal cortex and hippocampus to taste neophobia: Effect of neurotoxic lesions. *Behavioural brain research*, *284*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.017>
- Ramsaran, A. I., Sanders, H. R., & Stanton, M. E. (2016). Determinants of object-in-context and object-place-context recognition in the developing rat. *Developmental Psychobiology*, *58*(7), 883-895. <https://doi.org/10.1002/dev.21432>
- Rapp, P. R., Stack, E. C., & Gallagher, M. (1999). Morphometric studies of the aged hippocampus: I. Volumetric analysis in behaviorally characterized rats. *Journal of Comparative Neurology*, *403*(4), 459-470. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990125\)403:4<459::AID-CNE3>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990125)403:4<459::AID-CNE3>3.0.CO;2-9)
- Reger, M. L., Hovda, D. A., & Giza, C. C. (2009). Ontogeny of Rat Recognition Memory Measured by the Novel Object Recognition Task. *Developmental Psychobiology*, *51*(8), 672-678.
<https://doi.org/10.1002/dev.20402>
- Reilly, S., & Bornovalova, M. A. (2005). Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: A critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*(7), 1067-1088.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.025>
- Reio, T. G., & Choi, N. (2010). Novelty Seeking in Adulthood: Increases Accompany Decline. *The Journal of Genetic Psychology*. <https://doi.org/10.3200/GNTP.165.2.119-133>
- Robbins, T. W., Weinberger, D., Taylor, J. G., Morris, R. G., Roberts, A. C., Robbins, T. W., & Weiskrantz, L. (1996). Dissociating executive functions of the prefrontal cortex.

- Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 351(1346), 1463-1471. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0131>
- Roet, M., Pol, S., Schaper, F. L. W. V. J., Hoogland, G., Jahanshahi, A., & Temel, Y. (2019). Severe seizures as a side effect of deep brain stimulation in the dorsal peduncular cortex in a rat model of depression. *Epilepsy & Behavior*, 92, 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.01.007>
- Rolls, E. T. (2000). The orbitofrontal cortex and reward. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 10(3), 284-294. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.284>
- Rolls, E. T., Sanghera, M. K., & Roper-Hall, A. (1979). The latency of activation of neurones in the lateral hypothalamus and substantia innominata during feeding in the monkey. *Brain Research*, 164(1), 121-135. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90010-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90010-6)
- Rolls, T. (2004). The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain and Cognition*, 55(1), 11-29. [https://doi.org/10.1016/S0278-2626\(03\)00277-X](https://doi.org/10.1016/S0278-2626(03)00277-X)
- Rosenblum, K., Berman, D. E., Hazvi, S., Lamprecht, R., & Dudai, Y. (1997). NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(13), 5129-5135.
- Rosenblum, K., Meiri, N., & Dudai, Y. (1993). Taste memory: The role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behavioral and Neural Biology*, 59(1), 49-56. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(93\)91145-d](https://doi.org/10.1016/0163-1047(93)91145-d)
- Rosenblum, K., Schul, R., Meiri, N., Hadari, Y. R., Zick, Y., & Dudai, Y. (1995). Modulation of protein tyrosine phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), 1157-1161. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1157>

- Saalfield, J., & Spear, L. P. (2019). Fos activation patterns related to acute ethanol and conditioned taste aversion in adolescent and adult rats. *Alcohol*, *78*, 57-68.
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2019.02.004>
- Schoenbaum, G., & Setlow, B. (2003). Lesions of Nucleus Accumbens Disrupt Learning about Aversive Outcomes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *23*, 9833-9841. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-30-09833.2003>
- Selleck, R., Zhang, W., Samberg, H., Padival, M., & Rosenkranz, J. (2018). Limited prefrontal cortical regulation over the basolateral amygdala in adolescent rats. *Scientific Reports*, *8*.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35649-0>
- Shehadi, K., & Maroun, M. (2013). Different effects of low frequency stimulation to infralimbic prefrontal cortex on extinction of aversive memories. *Brain Research*, *1490*, 111-116.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.10.026>
- Smith, A., Centanni, S., Ghoshal, S., Winder, D., & Kenny, P. (2019). Identification of the Dorsal Peduncular Area as a Highly Novel Regulator of Opioid Reward. *Neuropsychopharmacology*, *44*(SUPPL 1), 517-518.
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *24*(4), 417-463.
[https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00014-2)
- Spear, L. P., Shalaby, I. A., & Brick, J. (1980). Chronic administration of haloperidol during development: Behavioral and psychopharmacological effects. *Psychopharmacology*, *70*(1), 47-58. <https://doi.org/10.1007/BF00432369>
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*(3), 171-177.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>

- Stansfield, K. H., & Kirstein, C. L. (2006). Effects of novelty on behavior in the adolescent and adult rat. *Developmental Psychobiology*, *48*(1), 10-15.
<https://doi.org/10.1002/dev.20127>
- Toki, S., Morinobu, S., Imanaka, A., Yamamoto, S., Yamawaki, S., & Honma, K. (2007). Importance of early lighting conditions in maternal care by dam as well as anxiety and memory later in life of offspring. *The European Journal of Neuroscience*, *25*(3), 815-829.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05288.x>
- Touzani, K., Bodnar, R. J., & Sclafani, A. (2010). Acquisition of glucose-conditioned flavor preference requires the activation of dopamine D1-like receptors within the medial prefrontal cortex in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *94*(2), 214-219.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.05.009>
- Uematsu, A., Kitamura, A., Iwatsuki, K., Uneyama, H., & Tsurugizawa, T. (2015). Correlation Between Activation of the Prelimbic Cortex, Basolateral Amygdala, and Agranular Insular Cortex During Taste Memory Formation. *Cerebral Cortex*, *25*(9), 2719-2728.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhu069>
- Uylings, H., Groenewegen, H., & Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res. Behavioural brain research*, *146*, 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.028>
- Vaidya, J. G., Grippo, A. J., Johnson, A. K., & Watson, D. (2004). A comparative developmental study of impulsivity in rats and humans: The role of reward sensitivity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1021*, 395-398. <https://doi.org/10.1196/annals.1308.051>
- Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2006). Ontogeny of Acute Tolerance to Ethanol-Induced Social Inhibition in Sprague-Dawley Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *30*(11), 1833-1844. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00220.x>
- Vetter-O'Hagen, C., Varlinskaya, E., & Spear, L. P. (2009). Sex differences in ethanol intake and sensitivity to aversive effects during adolescence and adulthood. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, *44*(6), 547-554. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn048>

- Westbrook, S. R., Brennan, L. E., & Stanton, M. E. (2014). Ontogeny of Object Versus Location Recognition in the Rat: Acquisition and Retention Effects. *Developmental Psychobiology*, *56*(7), 1492-1506. <https://doi.org/10.1002/dev.21232>
- Willcocks, A. L., & McNally, G. P. (2013). The role of medial prefrontal cortex in extinction and reinstatement of alcohol-seeking in rats. *European Journal of Neuroscience*, *37*(2), 259-268. <https://doi.org/10.1111/ejn.12031>
- Wilmouth, C. E., & Spear, L. P. (2009). Hedonic sensitivity in adolescent and adult rats: Taste reactivity and voluntary sucrose consumption. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *92*(4), 566-573. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.02.009>
- Winters, B. D., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *32*(5), 1055-1070. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.04.004>
- Wise, S. P. (2008). Forward Frontal Fields: Phylogeny and Fundamental Function. *Trends in neurosciences*, *31*(12), 599-608. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.08.008>
- Wu, L., Zhang, L., Shao, J., Qin, Y., Yang, R., & Zhao, Z. (2008). Effect of perinatal iron deficiency on myelination and associated behaviors in rat pups. *Behavioural Brain Research*, *188*(2), 263-270. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.11.003>
- Yamamoto, T. (2006). Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Archives of Histology and Cytology*, *69*(4), 243-255.
<https://doi.org/10.1679/aohc.69.243>
- Yonelinas, A P. (2001). Components of episodic memory: The contribution of recollection and familiarity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*, *356*(1413), 1363-1374. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0939>
- Yonelinas, Andrew P. (2002). The nature of recollection and familiarity: A review of 30 years of research. *Journal of Memory and Language*, *46*(3), 441-517.
<https://doi.org/10.1006/jmla.2002.2864>

Zola-Morgan, S., & Squire, L. R. (1985). Medial temporal lesions in monkeys impair memory on a variety of tasks sensitive to human amnesia. *Behavioral Neuroscience*, *99*(1), 22-34.

<https://doi.org/10.1037/0735-7044.99.1.22>

Zola-Morgan, S., & Squire, L. R. (1986). Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behavioral Neuroscience*, *100*(2), 155-160.

<https://doi.org/10.1037/0735-7044.100.2.155>

Publicaciones directamente relacionadas con la tesis

- Expósito AN, Morillas E, Gómez-Chacón B, Gallo M. Prefrontal cortex activity patterns during taste neophobia habituation in adult and aged rats. *Behav Brain Res.* 2020 Aug. DOI: 10.1016/j.bbr.2020.112717

Journal Impact Factor: 2019: 2.977. **Cuartil:** Q2 (Behavioral Sciences) 14/53.

- Expósito, A. N., & Gallo, M. (2021). Papel de la neocorteza en la memoria de reconocimiento de sabores desde una perspectiva del desarrollo. En F. Gámiz, & M. Rivera Sánchez, *Encuentros en Neurociencias* (Vol. VIII). Granada: Universidad de Granada.

ICEE: 2018: 177.000.

- Expósito, A. N., Vázquez-Ágredos, A., Menchén, S., Gámiz, F., & Gallo, M. (s.f.). Taste neophobia, latent inhibition of taste aversion and object recognition memory in adolescent rats. Submitted to *Animal Cognition*.

Journal Impact Factor: 2019: 2.859. **Cuartil:** Q1 (Zoology) 6/169.

Otras publicaciones

- Expósito A.N., Morillas, E., Gómez-Chacón, B., and Gallo, M. Increase of medial prefrontal cortex activation during taste neophobia habituation in adult and aged rats. Meeting Abstract. *Chemical Senses*. 42 - 42, pp. e32 - e33. 2017.
- Expósito A.N., Morillas, E., Gómez-Chacón, B., and Gallo, M. Increased medial prefrontal cortex activation during the habituation of flavor neophobia in adult and aged rats. Meeting Abstract. *Ars Pharmaceutica*. 59(Suppl. 1), 91. 2018
- Grau-Perales A, Exposito AN, Gómez-Chacón B, Morón I and Gallo M. Accumbens and amygdala in taste recognition memory: The role of d1 dopamine receptors. *Neurobiol Learn Mem*. 2020 Oct; 174:107277.
DOI: 10.1016/j.nlm.2020.107277.
- Grau-Perales, A, Morillas, E., Gómez-Chacón, B., Expósito, A. N., Juan-Córdoba, B., Morón, I. and Gallo, M. Dopamine D1 receptors blockade in the nucleus accumbens shell and attenuation of taste neophobia in rats. Meeting Abstract. *Ars Pharmaceutica*. 59 (Suppl. 1), 67. 2018

No es baladí la realización de una tesis doctoral. El volumen que sostienes entre tus manos es resultado de años de trabajo sostenidos por una cantidad ingente de emociones y maravillosas experiencias

Se establece, así como una etapa madurativa que nos hace más sabios y, por ello, más libres.

Pero el peso del volumen que sostienes sería mucho más liviano, si no inexistente, si no fuera por todas las personas que han acompañado su elaboración de forma directa o indirecta.

Estas personas han aportado el punto de apoyo sobre el que impulsarse a indagar en el vasto universo que conforma el cerebro.

La presente tesis es tan mía como suya, por ello, es un placer agradecerles a todas y cada una de ellas su apoyo y ayuda en este camino.

Obviamente mi primer pensamiento recae en Milagros, quien depositó su confianza en mí desde el primer momento. Gran profesional, gran persona, has aguantado todos los quebraderos de cabeza que te he dado en estos años, y aquí estamos, en el final de esta etapa. Te agradezco, con toda sinceridad, todas y cada una de las enseñanzas que me has inculcado, permitiéndome ver el mundo de una manera más ordenada. Aportándome las herramientas necesarias para seguir creciendo en este oficio. Enseñándome a amar la ciencia. Gracias por dejarme formar parte de esta familia llamada NEPLE.

A cada persona que conforma NEPLE, gracias por vuestros consejos, me habéis enseñado el valor de trabajar en equipo y ahora toma sentido la frase "individualmente somos una gota, juntos somos un océano".

En el laboratorio te cruzas con muchas personas, algunas ya siguieron su camino, otras siguen buscando la verdad aquí mismo y otras la buscan en nuevos lugares.

A las que siguieron su camino les debo mucho, a Bea por aguantar mi torpeza, a Enrique por enseñarme con paciencia, a Fabiola, por hacerme tanta compañía, a Álex por habernos acompañado en el camino y a Fernando, por tu simpatía y predisposición, te mereces todo lo bueno, también a Nacho, por enseñarme a hacer cirugías y hacerlo todo tan ameno.

A las que se quedan también les agradezco todo, a Sergio, por hacerlo todo más ameno, a Ana, por estar dispuesta a todo siempre y a Marta por entenderme al completo.

De toda la gente que he conocido en el laboratorio, resalto dos personas que han cambiado su destino, que ahora son amigas y lo serán para siempre, Bea y Clara, vuestro apoyo ha sido clave, de las más agradables sorpresas que da la vida, gracias por estar a mi lado, poco os puedo decir que no sepáis ya, gracias.

A la gente del CIBM, luchando por la "Salita 39", gracias por las risas.

Además, desde que empecé a estudiar psicología siempre ha habido alguien a mi lado, la vida no nos separa ni nos separará nunca, por tu buen humor, por tu ayuda, por tu confianza, por más años juntos, Clara, tú y yo contra el mundo.

Fuera del mundo académico existen otras grandes personas muy presentes en mi vida, aunque dispersas en el espacio.

A quien estuvo en los inicios, pero elegimos caminos distintos.

A mis amigos y amigas de Granada, Ximo, Sofía, Sebas y Adrián. Gracias por hacer estos años tan felices y divertidos.

A Elena, por seguirme en todas mis aventuras y crear aventuras nuevas.

A mis amigos y amigas de siempre, Angela, Javier, Patricia, Ana y todas los demás. Gracias por hacerme crecer como persona.

A Esther, la otra rodilla que configura la estabilidad en mi vida, hermana electa, compañera de buenos y males, la misma perspectiva desde distintos lugares.

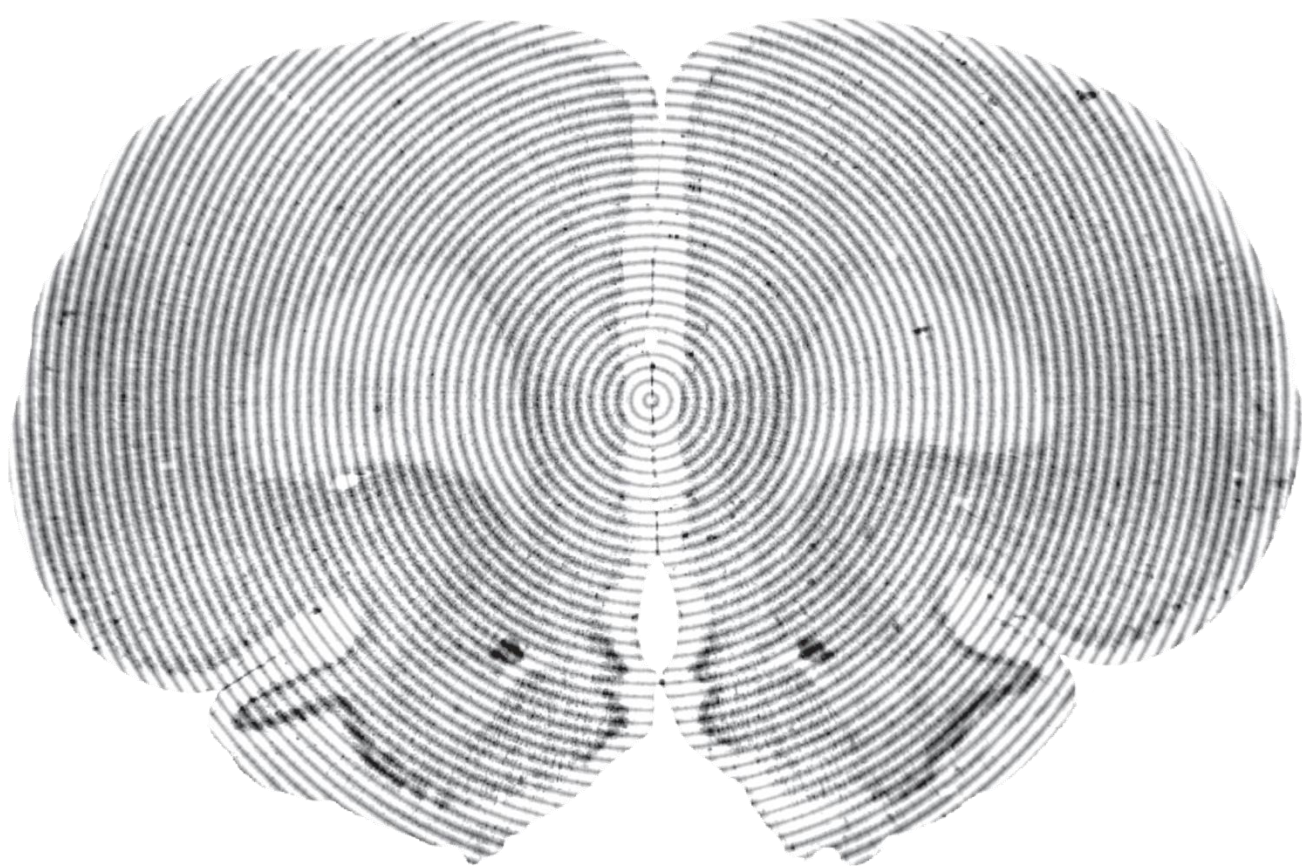
A Ángel, mi metro noventa de dudas, que aguantas mis días malos y me haces reír con tus ojillos azules. Dos palabras tuyas cambian la emoción de un día entero. Un peligro, pero cuánto me alegro de que estés aquí.

A toda mi familia, las que están y las que no.

A mi hermano, la mejor persona que existe, gracias por traer a mi vida a Elena, mi nueva familia. Y gracias a los dos por traer a este mundo a mi sobrino Hugo, ahora más importante que mi vida.

Y por supuesto, a mis padres. No hay palabras en ningún idioma que expresen todo el agradecimiento que siento por todo lo que me habéis dado. Por vuestro apoyo, vuestra inspiración y todo vuestro cariño. Todo lo que hago es y será siempre por vosotros.

A todas y todos, gracias.



Índice de abreviaturas:

µl: Microlitros	EI: Estímulo Incondicionado
6-OHDA: 6-Hidroxidopamina	ET: Tiempo de Exploración
ACC: Corteza Cingulada Anterior	Exp: Experimento
Ado NPre: Adolescentes No Pre-Expuestos	fMRI: Resonancia Magnética Funcional
Ado Pre: Adolescentes Pre-Expuestos	g: Gramos
Adul NPre: Adultos No Pre-Expuestos	H: Hora
Adul Pre: Adultos Pre-Expuestos	HC: Hipocampo
AI: Corteza Agranular	Th: Tálamo
AMY: Amígdala	i.p.: Intraperitoneal (Inyección)
AN: Atenuación de la Neofobia gustativa	IC: Corteza Insular
b.w.: Peso Corporal	IL: Corteza Infralímbica
BL: Línea Base de ingesta	LA: Amígdala Lateral
BLA: Amígdala Basolateral	LBN: Área Parabraquial Lateral
BNTS: Núcleo del Lecho de la Estría Terminal	LH: Hipotálamo Lateral
CeA: Amígdala Central	LI: Inhibición Latente
cm: Centímetros	LiCl: Cloruro de Litio
CTA: Condicionamiento Aversivo Gustativo	LO: Corteza Lateral Orbital
DA: Dopamina	IPFC: Corteza Prefrontal Lateral
DAB: Kit Substrato Peroxidasa	IPirCx: Corteza Piriforme Lateral
dmPFC: Corteza Prefrontal medial dorsal	M: Media
DMS: Igualación a la muestra demorada	MeA: Amígdala Medial
DNMS: Desigualación a la muestra demorada	ml: Mililitros
DP: Corteza Peduncular Dorsal	mm: Milímetros
DTI: Imagen Tensorial por Difusión	mPFC: Corteza Prefrontal medial
EC: Estímulo Condicionado	MRI: Resonancia Magnética Estructural
	NAcb Sh: Núcleo Accumbens Shell
	NAcb: Núcleo Accumbens

NOR: Reconocimiento de Objetos Novedosos

NTS: Núcleo del Tracto Solitario

PBN: Área Parabraquial

PBN: Núcleo Posteromedial del Área Parabraquial

PBS: Tampón Salino Fosfato

PFC: Corteza Prefrontal

PND: Día Post Natal

pPirCx: Corteza Piriforme Posterior

PrCM: Corteza Precentral

PrH: Corteza Perirhinal

PrL: Corteza Prelímbica

Sac: Sacarina

SD: Desviación Estándar

Sec: Segundos

SEM: Error Estándar de la Media

VIN: Vinagre 3%)

VLO: Corteza Ventral Orbital

vmPFC: Corteza Prefrontal ventral medial

VPFC: Corteza Prefrontal ventral

VPMpc: Núcleo Ventral Posteromedial del Tálamo

Abbreviation index:

μl: Microliters	fMRI: Functional magnetic resonance imaging
6-OHDA: 6-Hidroxidopamine	g: Grams
ACC: Anterior Cingulate Cortex	H: Hour
Ado NPre: Adolescent No Pre-Exposed	HC: Hippocampus
Ado Pre: Adolescent Pre-Exposed	Th: Thalamus
Adul NPre: Adult No Pre-Exposed	i.p.: Intraperitoneal (Injection)
Adul Pre: Adult Pre-Exposed	IC: Insular Cortex
AI: Agranular Cortex	IL: Infralimbic Cortex
AMY: Amygdala	LA: Lateral Amygdala
AN: Taste Neophobia Attenuation	LBN: Lateral parabrachial area
b.w.: Body Weight	LH: Lateral Hipothalamus
BL: Intake Baseline	LI: Latent Inhibition
BLA: Basolateral Amygdala	LiCl: Lithium chloride
BNTS: Bed Nucleus of stria terminalis	LO: Lateral Orbital Cortex
CeA: Central Amygdala	lPFC: Lateral Prefrontal Cortex
cm: Centimeters	lPirCx: Lateral Piriform Cortex
CTA: Conditioned Taste Aversion	M: Mean
DA: Dopamine	MeA: Medial Amygdala
DAB: Peroxidase Substrate Kit	ml: Mililiters
dmPFC: Dorsal medial Prefrontal Cortes	mm: Milíometers
DMS: Delayed Matching Sample	mPFC: Medial Prefrontal Cortex
DNMS: Delayed Non-Matching Sample	MRI: Structural Magnetic Resonance
DP: Dorsal Peduncular Cortex	NAcb Sh: Nucleus Accumbens Shell
DTI: Diffusion Tensor Imaging	NAcb: Nucleus Accumbens
EC: Conditioned Stimulus	NOR: Novel Object Recognition
EI: Unconditioned Stimulus	NTS: Nucleus of the solitary tract
ET: Exploration Time	PBN: Parabrachial Area
Exp: Experiment	PBS: Phosphate Buffered Saline
	PFC: Prefrontal Cortex

PND: Post Natal Day

pPirCx: Posterior Piriform Cortex

PrCM: Precentral Cortex

PrH: Perirhinal Cortex

PrL: Prelimbic Cortex

Sac: Saccharin

SD: Standard Deviation

Sec: Seconds

SEM: Standard error of the mean

VIN: Cider Vinegar (3%)

VLO: Ventral Orbital Cortex

vmPFC: Ventral medial Prefrontal Cortex

VPFC: Ventral Prefrontal Cortex

VPMpc: Posteromedial Ventral Nucleus of Thalamus

Índice de figuras y tablas:

Capítulo 1:

Figura 1. Tarea de reconocimiento de objetos novedosos (ORM).....	39
Figura 2. Proceso de atenuación de la neofobia gustativa (AN).....	42
Figura 3. Proceso de aversión condicionada al sabor (CTA) con inyección i.p. de Cloruro de Litio.....	43
Figura 4. Homólogos de las distintas subregiones que conforman la corteza prefrontal medial en cerebro de rata y humano.....	55

Capítulo 3:

Figure 1. A) Location of the microphotographs (100 microns, 40X) covering the regions of the mPFC assessed. The images were numbered following a dorso-ventral and medio-lateral axis. B) Representative microphotographs showing c-Fos positive cells in the anterior cingulate cortex (ACC), prelimbic cortex (PrL), infralimbic cortex (IL) and dorsal peduncular cortex (DP) of adult and aged rats belonging to the three familiarity groups (Novel, Familiar I and Familiar II).....	94
--	----

Table 1. Mean (\pm SEM) vinegar consumption (ml.) of the different adult and aged groups.....	98
---	----

Figure 2. Mean (\pm SEM) number of c-Fos positive cells in the mPFC regions according to a) dorsal versus ventral subdivision b) anterior cingulate cortex (ACC), prelimbic cortex (PrL), infralimbic cortex (IL) and dorsal peduncular cortex (DP). * vs. Familiar I group; # adult vs. aged groups.....	100
---	-----

Capítulo 4:

Figure 1. (A) Rate with respect to baseline of Adolescent group during the four cider-vinegar solution (Vin 3%) exposures. *vs Previous day ($p < .05$), #vs Water group ($p < .05$); (B) Rate with respect to baseline of Adult group during the four cider-vinegar solution (Vin 3%) exposures. *vs Previous day ($p < .05$), #vs Water group.....	119
--	-----

Figure 2. (A) Rate with respect to baseline of Adolescent group during the four saccharin solution (Sac 0,1%) exposures. *vs Previous day ($p < .05$), #vs Water group ($p < .05$); (B) Rate with respect to baseline of Adult group during the four saccharin solution (Sac 0,1%) exposures. *vs Previous day ($p < .05$), #vs Water group.....	124
--	-----

Figure 3. (A) Rate with respect to baseline during Conditioning session and One-Bottle test (Saccharin 0.1%) on Adolescent Pre-exposed (Ado Pre), Adolescent Non Pre-exposed (Ado NPre), Adult Pre-exposed (Adul Pre) and Adult Non Pre-exposed (Adul NPre). **(B)** Aversion Index during two-bottle test (Sac 0.1% vs water) on adolescent (pre-exposed and non pre-exposed to a saccharin solution 0.1%) and adult (pre-exposed and non pre-exposed to a saccharin solution 0.1%) groups. *vs Pre-exposed ($p < .05$) group, #vs Adult.....131

Figure 4. Novel object recognition (NOR) test performance. Mean (+SEM) exploration time of novel and familiar object for adolescent and adult groups. *vs Familiar ($p < .05$), #vs Adult.....137