

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGÍA



Universidad de Oviedo

TESIS DOCTORAL

Alberto Soto Sánchez

**CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIAS
GUSTATIVAS Y RESPUESTAS HEDÓNICAS**

**CONDITIONING OF TASTE PREFERENCES
AND HEDONIC RESPONSES**

Oviedo, 2015

Programa de Doctorado en Psicología

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGÍA



Universidad de Oviedo

TESIS DOCTORAL

Alberto Soto Sánchez

**CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIAS
GUSTATIVAS Y RESPUESTAS HEDÓNICAS**

**CONDITIONING OF TASTE PREFERENCES
AND HEDONIC RESPONSES**

Director: Dr. Matías López Ramírez

Oviedo, 2015

Programa de Doctorado en Psicología



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: <i>Condicionamiento de preferencias gustativas y respuestas hedónicas.</i>	Inglés: <i>Conditioning of taste preferences and hedonic responses.</i>
2.- Autor	
Nombre: Alberto Soto Sánchez	DNI/Pasaporte/NIE: -Z
Programa de Doctorado: Psicología	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

En esta tesis doctoral se estudiaron los cambios producidos en la valoración hedónica o afectiva de los fluidos durante el condicionamiento de preferencias gustativas en ratas. Este proceso de aprendizaje supone un aumento en la preferencia por sabores asociados previamente con otras soluciones gustativas con alto poder nutritivo o agradables desde el punto de vista de su palatabilidad. Para ello, se analizaron con la técnica de reactividad al sabor las reacciones oro-faciales de aceptación y/o rechazo de los fluidos mostradas por los animales durante su infusión directa en la cavidad bucal. El análisis de las respuestas oro-faciales ante los sabores permite examinar de forma más directa que las pruebas de consumo tradicionales los mecanismos de aprendizaje asociativo (aprendizaje sabor-sabor y aprendizaje sabor-nutriente) que median la adquisición de preferencias condicionadas por los sabores. Estos mecanismos asociativos implican tanto el procesamiento de las propiedades sensoriales de los fluidos como de su cualidad o valoración hedónica, pudiendo contribuir ambos procesos al desarrollo de preferencias alimentarias y gustativas.

En la Parte I de la tesis doctoral (Capítulos 1-3) se expone el marco teórico de la investigación, así como una descripción del paradigma de “aprendizaje de preferencia condicionada por el sabor” y los mecanismos asociativos (sabor-sabor y sabor-nutriente) que



pueden determinar esta variedad de aprendizaje. Se examinan también las diferentes técnicas o métodos usuales para medir la magnitud de las preferencias condicionadas por los sabores, en concreto la pruebas de preferencia o elección entre sabores y la prueba de reactividad al sabor.

La Parte II de la tesis constituye el desarrollo experimental del estudio. Se describen primero los objetivos específicos de la investigación (Capítulo 4), así como los materiales y métodos empleados en la misma (Capítulo 5), para abordar finalmente las diferentes series de experimentos realizados. La primera serie experimental (Capítulo 6) incluye tres estudios para evaluar el desarrollo de una preferencia gustativa por el sabor ácido de limón inducida con sacarina, sacarosa y maltodextrina, respectivamente. La segunda serie de tres experimentos (Capítulo 7) emplea la metodología de la devaluación del reforzador para evaluar su efecto sobre una preferencia gustativa previamente establecida. Tras el condicionamiento de la preferencia por el sabor a limón, se devaluaron respectivamente y para cada experimento las soluciones de sacarina, sacarosa y maltodextrina mediante su asociación con cloruro de litio (LiCl). En la última serie de experimentos (Capítulo 8) se examinó el efecto del valor hedónico inicial de la solución condicionada utilizando para ello sabores hedónicamente apetitivos (uva y cereza), como estímulos condicionados, y sacarina, sacarosa y maltodextrina como soluciones reforzantes. Un cuarto experimento cerró esta serie examinando el efecto selectivo de la devaluación de los diferentes atributos del reforzador sobre una preferencia gustativa condicionada anteriormente.

Cabe mencionar, por último, que el análisis de las respuestas hedónicas realizado en la tesis doctoral tiene una implicación práctica potencial, pudiendo aportar información relevante sobre los diferentes mecanismos de aprendizaje implicados en la adquisición de preferencias alimentarias en el ser humano y también a la hora de diseñar técnicas de intervención conductual encaminadas a promover en la población hábitos alimentarios saludables y para el tratamiento de patologías relacionadas con la conducta alimentaria



RESUMEN (en Inglés)

In this doctoral thesis, changes observed in the hedonic or affective value of fluids during flavour preference conditioning in rats were examined. This learning process entails an increased preference for flavours previously associated with other highly nutritious or pleasant taste solutions according to its palatability. To that end, the taste reactivity test was used to assess acceptance and/or rejection orofacial reactions to fluids shown by animals during its direct infusion into their mouth cavity. The analysis of orofacial responses to flavour allows us to examine the associative learning mechanisms (flavour-flavour and flavour-nutrient learning) that take part in the acquisition of conditioned flavour preferences more accurately than with traditional intake tests. These associative mechanisms imply not only the processing of the sensory properties of fluids, but also their hedonic value. Thus, both mechanisms can influence the development of food and flavour preferences.

In Part I of this doctoral thesis (Chapters 1-3), the theoretical framework of the research is presented, together with a description of the paradigm of “conditioned flavour preference learning” and the associative mechanisms (flavour-flavour and flavour-nutrient) that may determine this learning variety. Additionally, the range of usual techniques or methods used to measure the magnitude of conditioned flavour preferences has been studied. More specifically, preference or choice tests and the taste reactivity test.

Part II of this thesis contains the experimental development of the research. First of all, the specific aims of the research (Chapter 4) are described; secondly, the materials and the methodology used (Chapter 5); finally, the different series of experiments carried out are explained. The first experimental series (Chapter 6) includes 3 studies to assess the development of flavour preference for the sour flavour of lemon induced with saccharin, sucrose and maltodextrin, respectively. The second series of 3 experiments



(Chapter 7) uses the reinforcer devaluation method to assess its effect on a flavour preference that had been previously established. After conditioning lemon flavour preference, saccharin, sucrose and maltodextrin solutions respectively were devaluated in each of the experiments by associating them with lithium chloride (LiCl). In the last series of experiments (Chapter 8), the effect of the initial hedonic value of the conditioning solution was examined. To do so, hedonically appetitive flavours (grape and cherry) were used as conditioned stimulus and saccharin, sucrose and maltodextrin were used as reinforcing solutions. The fourth and final experiment of this series examined the selective effect of the devaluation of different reinforcing attributes on a previously conditioned flavour preference.

Finally, it is worth mentioning that the analysis of hedonic responses carried out in this doctoral thesis has a potential practical implication, as it provides relevant information about the different learning mechanisms involved in the acquisition of food preferences in human beings. Similarly, it could be used to design behavioural intervention techniques aiming to promote healthy eating habits among the population. Lastly, it could also be useful in the treatment of eating behaviour pathologies.

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a una beca pre-doctoral de la FICYT (Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología) concedida a Alberto Soto Sánchez (Ref.-BP11-059) y los proyectos de investigación financiados por el MICINN (Ref.- PSI-2009-08074 y PSI-2012-34743) a Matías López.



*“Que tus manos siempre estén ocupadas, que tus pies siempre sean veloces
y que tengas una fuerte base para cuando el viento cambie de golpe...
Que tu corazón siempre esté alegre, que tu canción sea siempre cantada.”*

Bob Dylan

Agradecimientos

Llegados a este punto, resulta imprescindible volver la vista atrás, aunque solo sea un segundo, con la intención de seguir avanzando y con el noble propósito de agradecer a tantas personas no solo el haber llegado hasta aquí, sino también el haber hecho de este viaje uno de los mejores y más enriquecedores de mi vida. No pretendo hacer alarde de la pluma y reconozco que mi lírica no pasa de aficionado pero, en este apartado, prometo que cada palabra sale del corazón. Hace ya varios años que tomé la decisión de enrolarme en este barco y adentrarme en el océano de la investigación. Un océano de incertidumbres, de preguntas y respuestas, de amistades, de inquietudes y de sueños por cumplir. Acordarse de todas esas personas que de algún modo han compartido este viaje es tarea más difícil de lo que parece. Por esta razón, pido disculpas por anticipado si alguien que merece estar en este cuaderno de bitácora se queda en el tintero.

En primer lugar y como no podría ser de otra manera, siempre en cubierta, con una mano en la brújula y la otra en el timón, el Dr. Matías López ha dirigido esta nave desde la profesionalidad y la experiencia, coordinando todas las actividades a bordo y haciéndolo siempre en un marco de confianza, amistad y afecto, muy difícil de encontrar por estos mares.

Patricia, contramaestre, dirigiendo las maniobras siempre con solvencia, experta en tejido de cabos, nudos marinos, mezcla de pinturas y todo lo que se ponga por delante para el buen funcionamiento de la nave. Gracias por resguardarme, por aleccionarme y por abrirme todas las puertas de los camarotes de este barco. Este trabajo es tanto mío como tuyo. Ahora surcas otros mares y te deseo la mejor de las suertes en tu aventura.

El patrón del barco en el que ahora navegas, el Dr. Dominic Dwyer, merece también mi gratitud y mi respeto, por hacer las cosas más que bien, por haberme acogido en su flota y por enseñarme pacientemente cómo funciona la marina lejos de nuestras velas. Caprichos del destino. Durante mi estancia bajo su mando he tenido la oportunidad de conocer a personas geniales.

Ángela, trabajadora incansable y luchadora incesante. Podrás pensar que estoy loco introduciéndote en estas líneas, pero lo cierto es que has hecho muchísimo en muy poco tiempo. Gracias por tus correcciones, por tus aportaciones lingüísticas, por ser como eres y, como dice la canción, “por los días que vendrán”.

Grumete Stefi, siempre dispuesta a ayudar en todo lo posible, realizando labores de estiba, mantenimiento e intendencia con la mejor de las sonrisas. La cubierta no es lo mismo cuando tú no estás sobre ella. Ojalá continúes en este barco por lo menos otros 4 años más. Y si eso no es posible, otro barco estará ansioso de acogerte. Potencial tienes de sobra.

Capturados en los remotos mares de Villayón y Gijón, condenados a viajar siempre en galeras, trabajando sin descanso en los barcos adyacentes de esta flota. Los compañeros que hacen el mismo viaje contigo son los mejores marineros con los que compartir vivencias, éxitos, fracasos y por qué no, alguna botella de ron de vez en cuando. Marta y Javi, habéis sido los mejores compañeros durante todos estos años. De la misma forma, muchas gracias a todos los marineros que en algún momento habéis formado parte de este viaje. Algunos ya navegáis solos, otros estáis a la espera de encontrar un nuevo barco, pero de todos he logrado aprender algo y a todos os deseo lo mejor: Camino, Elena, Félix, Susana, Javichu, Nacho...

Sobrecargo, Luis Laplaza, viejo lobo de mar y oficial al mando de su propio barco. Agradecido por tus consejos para este texto y sobre todo por tus abordajes, haciendo más que entretenidos los descansos durante estos últimos meses de trabajo.

Manteniendo siempre limpios, relucientes y preparados los cien cañones por banda, Piedad y Begoña, gracias por contribuir a que este barco navegara siempre viento en popa a toda vela.

No es de recibo olvidar a la gente que está en tierra, aquellos que te esperan siempre con un abrazo preparado para cuando vuelvas. Los amigos de la infancia, que sois muchos y sabéis bien cuándo estar: Héctor, Pepe, Di, César, María, Fer, Antonio, Nacho, Pablo, Noe, Diana, Elisa, Ana... por citar los más cercanos. “La collaciada”, siempre dispuesta a apurar un trago en cualquier

taberna de puerto. "Los Primos de Riesgo", Miguel y Jose, poniendo la música a este viaje que, si alguna vez tuvo algo malo, se disipó con el primer acorde. La "Juventus de Trubia", haciendo de los fines de semana algo más que un equipo, un sentimiento.

Finalmente, este viaje no habría sido posible, o al menos no hubiera llegado a buen puerto, sin el apoyo incondicional de mi familia. Mamá, derroche de generosidad y siempre entregada a los demás. Dispuesta a ofrecer amor incondicional fuesen cuales fuesen mis decisiones en alta mar. Papá, gran ejemplo y mejor persona. Las ganas de navegar algún día como tú, han sido el motor para embarcarme en una travesía como esta. Fran y Javi, humildes, cariñosos y altruistas. No todo el mundo tiene la suerte de tener dos hermanos mayores de vuestra categoría y yo soy un privilegiado. Si el mundo es un lugar maravilloso para vivir, por descubrir y donde naufragar, lo es sin duda por personas como vosotros. Beltrán y Paula, inocencia e ilusión por toneladas. Las razones, junto a Sofía (que ya vienes en camino), de que todos queramos ser mejores cada día.

Con este trabajo se acaba un viaje que ya comenzó hace 4 años. Un viaje donde cada parada ha servido para aprender, para continuar y para conocer a mucha gente. En mayor o menor medida, todos ellos han contribuido a que hoy yo sea como soy.

A todos os doy las gracias.

Índice de contenidos

PRESENTACIÓN

PARTE I. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO7

CAPÍTULO 1. Aprendizaje de preferencias y aversiones alimentarias9

1.1. Condicionamiento de aversiones gustativas.13

1.2. Condicionamiento de preferencias gustativas.....15

CAPÍTULO 2. Paradigma de preferencia condicionada por el sabor21

2.1. Aprendizaje sabor-sabor23

2.2. Aprendizaje sabor-nutriente25

2.3. Aprendizaje sabor-sabor vs Aprendizaje sabor-nutriente30

2.4. Otras consideraciones sobre el paradigma de preferencia condicionada33

CAPÍTULO 3. Medida de las preferencias gustativas39

3.1. Pruebas de consumo42

3.1.1. Prueba de exposición a un solo fluido42

3.1.2. Prueba de elección entre dos fluidos.....43

3.2. Prueba de reactividad al sabor45

3.3. Análisis del patrón del ingesta49

PARTE II. ESTUDIO EXPERIMENTAL53

CAPÍTULO 4. Objetivos de la investigación55

CAPÍTULO 5. Material y método general61

5.1. Sujetos experimentales.....63

5.2. Intervención quirúrgica e implante de cánulas64

5.3. Pruebas conductuales66

5.3.1. Test de reactividad al sabor66

5.3.2. Pruebas de consumo69

5.4. Procedimiento experimental70

5.4.1. Fase de privación.....70

5.4.2. Fase de entrenamiento71

5.4.3. Fase de devaluación.73

5.5. Análisis estadísticos.....74

CAPÍTULO 6. Evaluación del efecto de preferencia condicionada por el sabor y sus bases asociativas77

6.1. Experimento 1. Preferencia condicionada con sacarina como El.....	81
6.1.1. Sujetos y soluciones.	82
6.1.2. Procedimiento.	82
6.1.3. Resultados	85
6.2. Experimento 2. Preferencia condicionada con sacarosa como El	93
6.2.1. Sujetos y soluciones	94
6.2.2. Procedimiento	94
6.2.3. Resultados	96
6.3. Experimento 3. Preferencia condicionada usando maltodextrina como El ...	104
6.3.1. Sujetos y soluciones	105
6.3.2. Procedimiento.....	105
6.3.3. Resultados	107
6.4. Discusión de la serie experimental	115

CAPÍTULO 7. Efecto de la devaluación del reforzador sobre la preferencia condicionada119

7.1. Experimento 4. Efecto de la devaluación de la sacarina sobre la preferencia condicionada	123
7.1.1. Sujetos y soluciones	124
7.1.2. Procedimiento.....	125
7.1.3. Resultados	128
7.2. Experimento 5. Efecto de la devaluación de la sacarosa sobre la preferencia condicionada	137
7.2.1. Sujetos y soluciones	139
7.2.2. Procedimiento.....	140
7.2.3. Resultados	142
7.3. Experimento 6. Efecto de la devaluación de la maltodextrina sobre la preferencia condicionada	152
7.3.1. Sujetos y soluciones	154
7.3.2. Procedimiento.....	155
7.3.3. Resultados	157
7.4. Discusión de la serie experimental	167

CAPÍTULO 8. Valor hedónico del sabor y desarrollo de la preferencia condicionada	173
8.1. Experimento 7. Preferencia condicionada por sabores apetitivos y sacarina como El.....	177
8.1.1. Sujetos y soluciones	178
8.1.2. Procedimiento.....	178
8.1.3. Resultados	181
8.2. Experimento 8. Preferencia condicionada por sabores apetitivos y sacarosa como El.....	189
8.2.1. Sujetos y soluciones	191
8.2.2. Procedimiento.....	191
8.2.3. Resultados	193
8.3. Experimento 9. Preferencia condicionada por sabores apetitivos y maltodextrina como El	201
8.3.1. Sujetos y soluciones	202
8.3.2. Procedimiento.....	202
8.3.3. Resultados	204
8.4. Experimento 10. Efecto de la devaluación del reforzador con sabores apetitivos.....	212
8.4.1. Sujetos y soluciones	214
8.4.2. Procedimiento.....	214
8.4.3. Resultados	217
8.5. Discusión de la serie experimental	229
 CAPÍTULO 9. Discusión General	 235
 CAPÍTULO 10. Conclusiones	 251
 REFERENCIAS	 257

Índice de figuras

Figura 1. Reacciones apetitivas y aversivas universales	47
Figura 2. Implante de la cánula.....	65
Figura 3. Aparatología empleada durante el test de reactividad al sabor.....	67
Figura 4a. Experimento 1: Prueba de consumo.....	86
Figura 4b. Experimento 1: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad.....	88
Figura 4c. Experimento 1: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad	89
Figura 4d. Experimento 1: Prueba de extinción.....	92
Figura 5a. Experimento 2: Prueba de consumo.....	97
Figura 5b. Experimento 2: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad.....	99
Figura 5c. Experimento 2: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad	100
Figura 5d. Experimento 2: Prueba de extinción.....	103
Figura 6a. Experimento 3: Prueba de consumo.....	108
Figura 6b. Experimento 3: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad.....	110
Figura 6c. Experimento 3: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad	111
Figura 6d. Experimento 3: Prueba de extinción.....	114
Figura 7a. Experimento 4: Prueba de consumo.....	129
Figura 7b. Experimento 4: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad.....	132
Figura 7c. Experimento 4: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad	134
Figura 7d. Experimento 4: Prueba de extinción.....	136
Figura 8a. Experimento 5: Prueba de consumo.....	143
Figura 8b. Experimento 5: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad.....	146
Figura 8c. Experimento 5: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad	148
Figura 8d. Experimento 5: Prueba de extinción.....	150
Figura 9a. Experimento 6: Prueba de consumo.....	158
Figura 9b. Experimento 6: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad.....	161

Figura 9c. Experimento 6: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad	163
Figura 9d. Experimento 6: Prueba de extinción.....	165
Figura 10a. Experimento 7: Prueba de consumo.....	182
Figura 10b. Experimento 7: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad	184
Figura 10c. Experimento 7: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad	185
Figura 10d. Experimento 7: Prueba de extinción.....	188
Figura 11a. Experimento 8: Prueba de consumo.....	194
Figura 11b. Experimento 8: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad	196
Figura 11c. Experimento 8: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad	197
Figura 11d. Experimento 8: Prueba de extinción.....	200
Figura 12a. Experimento 9: Prueba de consumo.....	205
Figura 12b. Experimento 9: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad	207
Figura 12c. Experimento 9: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad	208
Figura 12d. Experimento 9: Prueba de extinción.....	211
Figura 13a. Experimento 10: Prueba de consumo.....	218
Figura 13b. Experimento 10: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad.....	220
Figura 13c. Experimento 10: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad	221
Figura 13d. Experimento 10: Prueba de consumo tras la devaluación	224
Figura 13e. Experimento 10: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad después devaluación	226
Figura 13f. Experimento 10: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad después devaluación	227

Índice de Tablas

Tabla 1. Respuestas características evaluadas en el test de reactividad.....	47
Tabla 2. Diseño Experimento 1	65
Tabla 3a. Experimento 1: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo	67
Tabla 3b. Experimento 1: Consumos registrados durante las pruebas de condicionamiento ...	86
Tabla 3c. Experimento 1: Respuestas registradas en la prueba de reactividad	88
Tabla 3d. Experimento 1: Consumos registrados durante la prueba de extinción	89
Tabla 4. Diseño Experimento 2	65
Tabla 5a. Experimento 2: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo	67
Tabla 5b. Experimento 2: Consumos registrados durante las pruebas de condicionamiento ...	86
Tabla 5c. Experimento 2: Respuestas registradas en la prueba de reactividad	88
Tabla 5d. Experimento 2: Consumos registrados durante la prueba de extinción	89
Tabla 6. Diseño Experimento 3	65
Tabla 7a. Experimento 3: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo	67
Tabla 7b. Experimento 3: Consumos registrados durante las pruebas de condicionamiento ...	86
Tabla 7c. Experimento 3: Respuestas registradas en la prueba de reactividad	88
Tabla 7d. Experimento 3: Consumos registrados durante la prueba de extinción	89
Tabla 8. Diseño Experimento 4	65
Tabla 9a. Experimento 4: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo	67
Tabla 9b. Experimento 4: Consumos registrados durante las pruebas de condicionamiento ...	86
Tabla 9c. Experimento 4: Respuestas registradas en la prueba de reactividad	88
Tabla 9d. Experimento 4: Consumos registrados durante la prueba de extinción	89
Tabla 10. Diseño Experimento 5	65
Tabla 11a. Experimento 5: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo	67
Tabla 11b. Experimento 5: Consumos registrados durante las pruebas de condicionamiento .	86
Tabla 11c. Experimento 5: Respuestas registradas en la prueba de reactividad	88

Tabla 11d. Experimento 5: Consumos registrados durante la prueba de extinción	89
Tabla 12. Diseño Experimento 6	65
Tabla 13a. Experimento 6: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo	67
Tabla 13b. Experimento 6: Consumos registrados durante las pruebas de condicionamiento .	86
Tabla 13c. Experimento 6: Respuestas registradas en la prueba de reactividad	88
Tabla 13d. Experimento 6: Consumos registrados durante la prueba de extinción	89
Tabla 14. Diseño Experimento 7	65
Tabla 15a. Experimento 7: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo	67
Tabla 15b. Experimento 7: Consumos registrados durante las pruebas de condicionamiento .	86
Tabla 15c. Experimento 7: Respuestas registradas en la prueba de reactividad	88
Tabla 15d. Experimento 7: Consumos registrados durante la prueba de extinción	89
Tabla 16. Diseño Experimento 8	65
Tabla 17a. Experimento 8: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo	67
Tabla 17b. Experimento 8: Consumos registrados durante las pruebas de condicionamiento .	86
Tabla 17c. Experimento 8: Respuestas registradas en la prueba de reactividad	88
Tabla 17d. Experimento 8: Consumos registrados durante la prueba de extinción	89
Tabla 18. Diseño Experimento 9	65
Tabla 19a. Experimento 9: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo	67
Tabla 19b. Experimento 9: Consumos registrados durante las pruebas de condicionamiento .	86
Tabla 19c. Experimento 9: Respuestas registradas en la prueba de reactividad	88
Tabla 19d. Experimento 9: Consumos registrados durante la prueba de extinción	89
Tabla 20. Diseño Experimento 10	65
Tabla 21a. Experimento 10: Ingesta de las diferentes soluciones en las pruebas de consumo .	67
Tabla 21b. Experimento 10: Consumos registrados en las pruebas de condicionamiento.....	86
Tabla 21c. Experimento 10: Respuestas registradas en la prueba de reactividad	88
Tabla 21d. Experimento 10: Consumos registrados durante las prueba.....	89
Tabla 21d. Experimento 10: Respuestas en la prueba de reactividad tras la devaluación	89

Abreviaturas

EC: estímulo condicionado

EC-: Estímulo condicionado presentado sin reforzador

EC+: Estímulo condicionado presentado conjuntamente con un reforzador

EI: Estímulo incondicionado

IO: Administración intraoral

LiCl: Cloruro de litio (nomenclatura internacional)

RC: Respuesta condicionada

RI: Respuesta incondicionada

SEM: Error típico de la media (nomenclatura internacional)

TRT: Test de reactividad al sabor

Presentación

En esta tesis doctoral se examinan los cambios producidos en la valoración hedónica o afectiva de los sabores tras el condicionamiento de una preferencia gustativa en ratas. Este proceso de aprendizaje implica un cambio en la preferencia por un sabor que se ha asociado previamente con una solución nutritiva o de alta palatabilidad. Para ello se analizan las reacciones orofaciales de aceptación y de rechazo mostradas por los animales cuando se les administran los sabores en la cavidad bucal. El análisis de estas respuestas mediante la técnica de reactividad al sabor permite examinar, de forma más fehaciente que la prueba habitual de consumo o ingesta del fluido, los mecanismos de aprendizaje asociativo (asociaciones sabor-sabor y sabor-nutriente) que determinan la adquisición de preferencias gustativas. Estos procesos asociativos implican tanto el procesamiento de las propiedades sensoriales de los sabores como su cualidad hedónica, pudiendo contribuir ambos mecanismos al condicionamiento de preferencias gustativas.

En el desarrollo de este estudio se emplearon, como estímulos incondicionados, sustancias con diferentes cualidades hedónicas y nutritivas para inducir la preferencia condicionada por el sabor. Por su alta palatabilidad y ausencia de valor nutricional, una solución endulzada de sacarina es un estímulo incondicionado adecuado para evaluar la contribución del mecanismo asociativo sabor-sabor al aprendizaje de una preferencia gustativa. La carencia del componente sensorial de dulzor en la maltodextrina, un polímero de glucosa con alto poder nutritivo, hace de esta sustancia un estímulo adecuado para evaluar la mediación del proceso asociativo sabor-nutriente. Por último, una solución endulzada de sacarosa, que posee tanto el componente sensorial como el calórico, permite comparar la contribución de ambos mecanismos asociativos en el aprendizaje de preferencias condicionadas por los sabores.

Dado que pueden influir diversas variables en la adquisición y expresión de una preferencia gustativa, en este trabajo se examinó también el efecto que tiene sobre la preferencia adquirida la devaluación o reducción del valor hedónico del estímulo incondicionado, así como la influencia del valor hedónico inicial del sabor que se pretende condicionar. La devaluación de las sustancias empleadas para inducir las preferencias condicionadas (sacarina, sacarosa y maltodextrina) se produjo con el agente emético cloruro de litio, observando su efecto sobre la preferencia previamente establecida. La utilización de sabores apetitivos (uva, cereza) como estímulos condicionados permitió evaluar la influencia del valor hedónico inicial o incondicionado de la solución gustativa sobre el condicionamiento de la preferencia.

En la Parte I de la Tesis doctoral (Capítulos 1-3) se expone el marco teórico de la investigación, así como una descripción pormenorizada del paradigma de aprendizaje “preferencia condicionada por el sabor” y de los mecanismos asociativos (sabor-sabor y sabor-nutriente) que pueden mediar en esta forma de aprendizaje. Se examinan también las diferentes técnicas o métodos empleados habitualmente para medir la magnitud de una preferencia condicionada.

La Parte II de la Tesis constituye el desarrollo experimental del estudio. Se describen primero los objetivos específicos de la investigación (Capítulo 4) y los materiales y métodos empleados en la misma (Capítulo 5), para abordar finalmente las diferentes series de experimentos realizados. La primera serie experimental (Capítulo 6) incluye tres estudios para evaluar el desarrollo de una preferencia gustativa por el sabor ácido de limón inducida con sacarina, sacarosa y maltodextrina, respectivamente. La segunda serie de tres experimentos (Capítulo 7) emplea la metodología de la devaluación del reforzador

para evaluar su efecto sobre una preferencia gustativa previamente establecida. Tras el condicionamiento de la preferencia por el sabor a limón se devaluaron, respectivamente y para cada experimento, las soluciones de sacarina, sacarosa y maltodextrina mediante su asociación con LiCl. En la última serie de experimentos (Capítulo 8) se examinó el efecto del valor hedónico inicial de la solución condicionada utilizando para ello sabores a uva y cereza como estímulos condicionados, y sacarina, sacarosa y maltodextrina como estímulos incondicionados. Un cuarto experimento cerró esta serie examinando el efecto de la devaluación selectiva de los diferentes componentes del reforzador sobre las preferencias condicionadas a los sabores apetitivos.

Cabe mencionar, por último, que el análisis de las respuestas hedónicas condicionadas presentado en esta tesis doctoral podría tener una implicación práctica potencial, ofreciendo información relevante sobre los diferentes mecanismos de aprendizaje implicados en las preferencias gustativas condicionadas a la hora de diseñar técnicas de intervención conductual encaminadas a fomentar el consumo de determinados alimentos que puedan ser de interés para promover una alimentación equilibrada o para el tratamiento de patologías relacionadas con la conducta alimentaria.

Parte I

Introducción y Marco teórico

Capítulo 1

**Aprendizaje de preferencias y
aversiones alimentarias**

Una de las conductas más importantes para la supervivencia de multitud de especies animales, incluido el ser humano, es posiblemente la alimentación. La búsqueda de comida y la selección de los alimentos son actividades necesarias y frecuentes que constituyen uno de los mayores retos evolutivos (Rozin, 2007; Rozin y Schulkin, 1990). En este sentido, el aprendizaje acerca de las consecuencias de la ingesta cumple un papel primordial en la selección de la dieta y puede expresarse tanto en la adquisición de preferencias por ciertos sabores o alimentos (preferencias gustativas condicionadas) como en el rechazo de sustancias asociadas con consecuencias gástricas negativas (aversiones gustativas o aversión condicionada al sabor). En el ser humano, las preferencias y las aversiones están enraizadas profundamente en el sustrato cultural y son uno de los últimos legados que se pierden durante la inmigración de una persona o grupo a un nuevo hábitat sociológico (Rozin, 1980). Sin embargo, la herencia cultural convive hoy en día con una gran diversidad en lo que a gustos se refiere dentro de un mismo contexto social. Así pues y como indica un estudio clásico de Bayés (1983), realizado en una muestra de estudiantes de la Universidad Autónoma de Barcelona, los alimentos que resultan los más preferidos por algunas personas son precisamente los más rechazados por otras.

A nivel general y desde una perspectiva evolutiva, los animales omnívoros, como la rata, muestran preferencias alimentarias basándose, en muchos casos, en los sabores de las sustancias. Así pues, muchos organismos están genéticamente predispuestos a rechazar sabores ácidos y amargos, frecuentemente relacionados con sustancias nocivas para el organismo (Birch, 1999). De la misma forma, existen otras sustancias potencialmente perjudiciales que difícilmente podrían identificarse como tales por su sabor, desarrollando algunas especies otro tipo de recursos adaptativos

entre los que destaca la neofobia (rechazo de sabores novedosos). Esto es, cuando los animales se exponen a alimentos o fluidos por vez primera ingieren pequeñas cantidades de estas sustancias para, en el caso de ser nocivas, sufrir solamente una disfunción gástrica transitoria y evitar la muerte (Birch y Fisher, 1996; Domjan, 2009). Por el contrario, tan solo las preferencias por los sabores dulces y salados parecen innatas (Rozin, 1996). Por ejemplo, en ratas, la preferencia por un sabor dulce como la sacarosa parece emerger alrededor de las 2 semanas tras su nacimiento, sin necesidad de experiencia previa (Hall y Bryan, 1981), mientras que ya alrededor de los 10 días de vida se han encontrado preferencias a favor de una solución de salino hipertónico frente a agua (Bernstein y Courtney, 1987).

Los animales refinan sus preferencias gustativas a través de la experiencia. De hecho, la amplia variedad de preferencias por diferentes sabores que muestran los adultos frente a los recién nacidos, la gran plasticidad existente a lo largo de la vida en lo que a preferencias se refiere y el rango de diferencias individuales, se atribuyen al efecto del aprendizaje (Capaldi, 1996; Myers y Sclafani, 2006). Los mecanismos de aprendizaje implicados en el desarrollo de las aversiones gustativas se han estudiado exhaustivamente a nivel conductual y neurobiológico (ver revisión de Reilly y Schachtman, 2009) pero se ha profundizado menos en la naturaleza de los procesos responsables de la adquisición de preferencias gustativas, un conocimiento que puede resultar relevante para el tratamiento conductual y farmacológico de diversos trastornos de la conducta alimentaria.

1.1. Condicionamiento de aversiones gustativas

Durante las últimas décadas, numerosos investigadores han realizado estudios para comprender los mecanismos conductuales y neurobiológicos implicados en el aprendizaje de las aversiones gustativas. Además, se ha identificado este tipo de aprendizaje en una gran variedad de especies, desde invertebrados (Sahley, Rudy y Gelperin, 1981) hasta humanos (Bernstein, 1978; Logue, 1985).

Ya en el contexto de la Segunda Guerra Mundial, el creciente interés por el control de las plagas de roedores en las trincheras y por el estudio de los efectos de la radiación en los seres vivos incentivaron diversas investigaciones para desarrollar nuevos venenos y cebos. (Freeman y Riley, 2009, para una revisión histórica). Los resultados de los estudios relativos al control de plagas, pusieron de manifiesto la capacidad de las ratas para asociar las cualidades sensoriales de la comida con el malestar provocado por el veneno que se proporcionaba conjuntamente con los alimentos, evitándolos en ocasiones sucesivas (Rzóska, 1954). Las investigaciones relacionadas con el efecto de la radiación en los seres vivos mostraron que el consumo de una solución de sacarina se veía reducido cuando esta solución se emparejaba con el malestar provocado por las exposiciones a la radiación (García, Kimeldorf y Koelling, 1955). En términos de condicionamiento clásico, el sabor de la sacarina funcionaría como un estímulo condicionado (EC) y las consecuencias de la administración de la radiación (malestar gástrico, etc.) actuarían como el estímulo incondicionado (EI). Como resultado, la clave gustativa es capaz de anticipar los efectos nocivos de la radiación (la respuesta condicionada).

Sin embargo, el aprendizaje aversivo gustativo tiene una serie de características que lo diferencian del condicionamiento clásico en sentido estricto y lo convierten en un tipo de aprendizaje asociativo muy particular:

- a) En primer lugar, la relación entre los estados internos y las claves gustativas (así como las olfativas) se puede adquirir de forma muy rápida, incluso en un solo ensayo de condicionamiento (García et al., 1955).
- b) Así mismo, se puede producir el aprendizaje aversivo gustativo incluso con demoras largas entre la experiencia con el EC (el sabor) y el EI (García y Koelling, 1966). Algunos estudios han logrado condicionamientos incluso con intervalos comprendidos entre 4 y 12 horas (Schafe y Bernstein, 1996). Además, paradójicamente, Schafe, Sollars y Bernstein (1995) encontraron que, utilizando intervalos breves, más parecidos a los utilizados en el condicionamiento pavloviano (entre 0,5 y 2 segundos), se dificultaba el condicionamiento de una aversión alimentaria.
- c) Otra característica de este tipo de aprendizaje es la naturaleza selectiva de las asociaciones formadas. Es decir, la adquisición de la respuesta parece depender de la asociación de un estímulo específico (sabor, olor o apariencia del alimento) con una consecuencia específica (alteraciones gastrointestinales o náusea) y no entre esas claves y otro tipo de señales exteroceptivas (descargas, por ejemplo).

Estas características particulares del aprendizaje aversivo gustativo pueden entenderse mejor desde una perspectiva evolutiva. En este contexto, la rápida adquisición de las aversiones alimentarias permitiría aprender a evitar un alimento tóxico con una sola exposición al mismo y, por tanto, incrementar las probabilidades

de supervivencia. Así mismo, para que el aprendizaje de las aversiones alimentarias tenga un sentido filogenético, el proceso asociativo que subyace al condicionamiento debería producirse a pesar de la inevitable demora entre la ingestión y la digestión. En la misma línea, García, Lasiter, Bermúdez-Rattoni y Deems (1985) intentaron explicar la utilidad evolutiva de la asociabilidad selectiva hipotetizando la existencia de dos sistemas de defensa. Por un lado, un mecanismo que relacionaría los cambios gastrointestinales con las cualidades sensoriales de los alimentos que se consumen, lo que dotaría al individuo de una cierta capacidad de predicción en base a la experiencia ante plantas y animales que utilizan toxinas para protegerse (asociación entre sabor y alteraciones en el estado interno del organismo) y, por otro lado, un sistema que relacionaría las claves ambientales con situaciones peligro y con el dolor, lo que podría permitir defenderse de los depredadores. En definitiva, el proceso de selección natural parece haber preparado al organismo

1.2. Condicionamiento de preferencias gustativas

Muchos estudios se han llevado a cabo desde que Jacques LeMagen, discípulo del fisiólogo francés Henri Piéron, sugiriera en 1955 que la adquisición de una preferencia por el sabor podría deberse a un fenómeno de condicionamiento clásico (Turner, Friedman, y Mehiel, 2004). En este sentido, LeMagen fue la primera persona en desarrollar, en su laboratorio de neurofisiología sensorial y del comportamiento, instrumentos que hicieron posible el registro de la ingesta de comida y agua en animales de experimentación (como la rata) a lo largo de las 24 horas del día, mostrando cómo cambiaba este comportamiento bajo la influencia de los ritmos circadianos y en función de las características sensoriales de los alimentos (olfativas,

gustativas y visuales). Estos atributos sensoriales podían funcionar como un estímulo condicionado complejo que guiaba el comportamiento en lo que él denominaba “*el aprendizaje de palatabilidad*”, permitiendo la formación de preferencias y aversiones alimentarias que determinaban la cantidad de comida o bebida que los animales ingerían en función de las consecuencias metabólicas derivadas de esta ingesta. Adicionalmente, su laboratorio confirmó que estos mismos factores sensoriales y metabólicos funcionaban también de manera similar en los seres humanos (Bellisle, Laffort y Köster, 2003).

Como ya se ha comentado en los omnívoros (como la rata y el ser humano) la mayoría de preferencias alimentarias se adquieren mediante la experiencia. Según Capaldi (1996), el aprendizaje puede incrementar la preferencia por un determinado alimento de diferentes formas:

La más simple se produce por el efecto de la familiaridad, también llamado “efecto de mera exposición”. Es decir, el consumo repetido de un alimento sin consecuencias negativas incrementa la preferencia por el mismo (Capaldi, 1996). Tal es así, que diversos estudios realizados con cachorros prematuros indican la posibilidad de que las preferencias gustativas empiezan a configurarse durante los periodos de lactancia o incluso de gestación (Hill y Mistretta, 1990). En este sentido, algunas investigaciones realizadas con ratas, muestran una relación entre el nivel de consumo de sodio de las madres durante el embarazo y la preferencia que más tarde los cachorros muestran por la sal (Hill y Prezekop, 1988). En esta línea, también se ha demostrado en ratas recién nacidas un aumento en la palatabilidad de determinadas sustancias, como el etanol, cuando es proporcionado previamente a las madres en determinadas fases del embarazo (Díaz-Cenzano y Chotro, 2010). Otras investigaciones

con animales indican que, durante el periodo de lactancia, los sabores que proceden de los alimentos ingeridos por la madre pueden transmitirse a la leche modificando su sabor (Galef, 1996). De esta forma, la exposición “indirecta” a la dieta de la madre durante el periodo de lactancia puede incidir en las preferencias alimentarias de los cachorros en el periodo de destete. Los animales prefieren los sabores de la dieta consumida por la madre y parecen aceptar mejor los alimentos que no les son familiares si han experimentado una amplia variedad de sabores por medio de la leche materna (Bilkó, Altbacker y Hudson, 1994; Hunt, Kraebel, Rabine, Spear y Spear, 1993). Las inferencias en humanos son lógicamente más complejas pero, al igual que en otros mamíferos, los alimentos ingeridos por la madre durante la lactancia podrían modificar el sabor de la leche y proporcionar a sus bebés una experiencia sensorial más variada que la que poseerían los niños alimentados sólo con biberón (Mennella y Beauchamp 1996). De la misma forma, los niños tienden a rechazar las comidas que no les resultan familiares (neofobia), pero este rechazo puede modificarse mediante la exposición repetida (entre 8 y 10 veces) a estos alimentos sin experimentar consecuencias negativas (Birch y Fisher, 1996). No obstante, aunque produzca un aumento en la preferencia por ciertos alimentos, la mera exposición no parece generar unas preferencias muy robustas.

Otra de las formas por las que el aprendizaje puede incrementar la preferencia por un alimento, es el llamado “efecto medicamento” (Capaldi, 1996). En diversos estudios realizados con ratas, se ha observado un incremento en la preferencia por un alimento presentado justo antes de la recuperación de un trastorno gastrointestinal. Sin embargo, al igual que el efecto de mera exposición, este fenómeno explica solo un

pequeño porcentaje de las preferencias alimentarias, ya que la mayoría de los alimentos no suelen asociarse con la recuperación de una enfermedad.

Así pues, los efectos de preferencia más significativos se atribuyen al condicionamiento clásico o pavloviano, a través del cual un sabor inicialmente neutro (o incluso moderadamente aversivo) puede llegar a ser preferido a través de asociaciones repetidas con las propiedades (nutritivas, calóricas) de otra sustancia con la que se combina (Myers y Sclafani, 2006; Rozin y Zellner, 1985).

De la misma forma que ocurre en las aversiones alimentarias, cabe destacar algunas características concretas que hacen singular el aprendizaje de preferencia basado en el condicionamiento clásico:

- a) En los primeros estudios sobre preferencias condicionadas se realizó un número muy elevado de ensayos de condicionamiento. Holman (1975), en sus trabajos basados en la asociación de diferentes sabores, llegó a emplear hasta 20 emparejamientos. Más adelante, se han encontrado claros efectos de preferencia condicionada con 6 ensayos de condicionamiento (Capaldi, Myers, Campbell y Sheffer, 1983), también con 4 (Díaz, De la Casa, Ruiz y Baeyens, 2004; Mehiel y Bolles 1988), con tan solo 2 (Boakes, Rossi-Arnand y García-Hoz, 1987) e incluso únicamente con 1 emparejamiento (Myers, 2007). Esto posee una gran significatividad desde el punto de vista ecológico y adaptativo ya que, el hecho de que la preferencia condicionada pueda ser adquirida en un solo ensayo, proporciona una experiencia comparable a lo que podría ocurrir en una sola comida cuando los animales se están alimentando. En cualquier caso, el número de ensayos necesario no ha sido sistemáticamente estudiado pero los datos existentes sugieren un condicionamiento muy rápido.

- b) Las preferencias condicionadas son sorprendentemente resistentes a la extinción (Delamater, 2012; Díaz y De la casa, 2011), encontrando procedimientos en los que la preferencia adquirida puede llegar a persistir hasta 28 días sin síntomas de disminución (Capaldi et al., 1983).

- c) Dependiendo del mecanismo de aprendizaje implicado en el desarrollo de la preferencia, ésta puede desarrollarse incluso con un intervalo muy amplio entre los sabores presentados. Por ejemplo, cuando el aprendizaje se basa exclusivamente en la palatabilidad de las sustancias, se produce una preferencia condicionada cuando el intervalo entre el sabor que se pretende condicionar y un reforzador con alta palatabilidad es mínimo, siendo frecuente para este tipo de asociación utilizar un procedimiento en el que los estímulos forman un compuesto (Mehiel y Bolles 1988). No así cuando la preferencia está basada en los efectos nutritivos del reforzador, observándose el efecto de preferencia condicionada incluso con demoras de 1 a 5 horas (Capaldi y Sheffer, 1992).

El procedimiento más común para estudiar de forma experimental la adquisición de este tipo de preferencias basadas en el condicionamiento clásico es el paradigma de “preferencia condicionada por el sabor” (ver Sclafani, 1999). Dado que este paradigma ha sido el procedimiento elegido para la realización de este estudio, merece ser desarrollado a continuación con más detalle.

Capítulo 2

**Paradigma de preferencia
condicionada por el sabor**

En términos generales, este paradigma de aprendizaje consiste en proporcionar al animal un sabor novedoso (EC) emparejado con una sustancia u otro sabor con propiedades reforzantes (EI). Como consecuencia de esta experiencia, aumenta el consumo o la preferencia por dicho sabor. Las cualidades reforzantes de la solución que provoca la preferencia condicionada pueden referirse a su palatabilidad o valor hedónico (Holman, 1975), lo que daría lugar a un tipo de aprendizaje denominado “sabor-sabor”, y también a las consecuencias de la ingestión de la solución, como sus efectos calóricos o nutritivos, un tipo de aprendizaje denominado “sabor-nutriente” (Harris, Shand, Carroll y Westbrook, 2004). El desarrollo de la preferencia se suele expresar como un aumento del consumo del sabor previamente asociado con la sustancia agradable o el nutriente frente a agua (o frente a un sabor alternativo) en una prueba de consumo posterior con ambos fluidos. Estos dos tipos o mecanismos de aprendizaje, sabor-sabor y sabor-nutriente, y sus particularidades forman el cuerpo experimental de esta tesis, razón por la cual se desarrollarán a continuación de manera más amplia.

2.1. Aprendizaje sabor-sabor

Diversos estudios (Capaldi et al., 1983; Lyn y Capaldi, 1994) realizados con ratas indican que cuando se ingiere un sabor, cuya preferencia inicial es baja, con una solución dulce de sacarosa, por ejemplo, la preferencia por dicho sabor aumenta cuando se presenta solo. Como ya comentamos anteriormente, la preferencia por los sabores dulces parece estar determinada genéticamente. Basándose en este hecho, Holman (1975) observó un aumento en la preferencia por un sabor mezclado con una solución de sacarina de alta concentración, en comparación con otro sabor

emparejado con una concentración más baja de sacarina. La preferencia por el primero de los sabores aumentó debido a su asociación con el sabor dulce de la sacarina con una concentración mayor, ya que esta sustancia carece de poder nutritivo. Además, este tipo de asociación puede ser muy duradera en el tiempo. Esto podría explicar, en parte, cómo diversas sustancias con sabores que inicialmente no son atractivos pueden llegar a serlo, como en el caso del café. La mayoría de las personas consumen café con azúcar y/o con leche o crema y más tarde empiezan a apreciar con gusto el sabor amargo del café solo (Capaldi, 1996). En este sentido, si se empareja el sabor amargo del café con el sabor dulce del azúcar o la crema, se incrementa la preferencia por el sabor del café (los efectos derivados de la ingestión del azúcar también contribuyen a este efecto, como veremos más adelante). Lo mismo ocurre con el té. Zellner, Rozin, Aron y Kulish (1983) observaron en humanos, con diferentes variedades de té con las que no estaban familiarizados, un aumento en la preferencia por una de ellas tras consumirla endulzada frente a otra variedad que se había proporcionado sin endulzar.

En estos estudios de aprendizaje sabor-sabor, los sabores fueron mezclados en una solución conjunta. Pero este aprendizaje es también posible con un corto intervalo de tiempo entre la ingesta de ambas soluciones. En un experimento clásico, Lavin (1976) quiso observar esta situación con ratas y les proporcionó dos sabores diferentes para beber de forma sucesiva y acto seguido les dio una sustancia tóxica inmediatamente después de consumir el segundo de los sabores. El resultado fue el desarrollo de una aversión a ambas soluciones, demostrando que se había formado una asociación entre los dos sabores dados inicialmente. Pero esta asociación se formaba sólo si los sabores se consumían con un intervalo inferior a 9 segundos. Más

tarde, Lyn y Capaldi (1994) replicaron este hallazgo pero usando un reforzador apetitivo para el condicionamiento. Tras consumir los dos sabores de forma sucesiva, uno de ellos era emparejado con sacarosa. Después de esto, la preferencia por ambos sabores se vio incrementada. Capaldi (1996), en un estudio realizado con estudiantes de secundaria, así como Havermans y Hansen (2007), con niños que rondaban los 5 años de edad, observaron también un incremento en el grado de preferencia por diferentes verduras, como la coliflor o el brócoli, tras haberlas mezclado primero con otra solución que endulzaba su sabor. Todos estos datos sugieren que un método tan simple como mezclar un alimento, bien con una sustancia dulce o bien con otro alimento preferido, podría ser una buena técnica para instaurar hábitos alimentarios sanos. Sin embargo, muy pocos padres suelen emplear este sistema para moldear las preferencias alimentarias de sus hijos. Paradójicamente, en la cultura occidental, gran parte de nuestra alimentación se basa en la mezcla de grasas y dulces, utilizando este principio para instaurar, mantener o promover preferencias por una dieta poco saludable (García y Bach, 1999).

2.2. Aprendizaje sabor-nutriente

Hay muchos estudios que indican cómo aumenta la preferencia por un alimento que se mezcla con otro que tiene un elevado contenido calórico (Mehiel y Bolles, 1988; Sclafani, 1990). En este sentido, al igual que ocurre con el aprendizaje sabor-sabor, otro proceso de aprendizaje puede darse bajo condiciones “similares”. Cuando un sabor es mezclado con una sustancia como el azúcar, que posee un cierto poder calórico y también un sabor agradable, el sabor puede asociarse tanto con el sabor dulce como con los efectos que provoca en el organismo el poder nutritivo de la

sacarosa. Es decir, parece que los animales estarían programados para aprender a preferir los sabores asociados con alimentos de alto contenido calórico y, por tanto, podrían aprender más rápidamente a ingerir alimentos nutritivos.

En los estudios de Holman (1975), descritos anteriormente, se comprobó cómo aumenta la preferencia por un sabor asociado con una concentración alta de sacarina. En este tipo de aprendizaje no existía ningún componente nutritivo involucrado, indicando que el aprendizaje sabor-sabor y el aprendizaje sabor-nutriente podrían ser dos procesos independientes. Esta situación se hace difícil de comprobar en la vida cotidiana, fuera de situaciones experimentales donde se intentan controlar las diferentes variables que puedan influir, dado que la mayoría de sustancias calóricas suelen tener un sabor agradable. En este sentido, algunas de las características de la asociación sabor-nutriente y una metodología específica han ayudado a diferentes autores a determinar la naturaleza de esta modalidad concreta de aprendizaje.

En primer lugar y dado que la asociación sabor-sabor no es posible si se da un cierto retraso entre la presentación de los estímulos, algunos trabajos han demostrado preferencias condicionadas con importantes demoras entre la presentación del sabor y sus consecuencias, un resultado que sólo sería compatible con un mecanismo de aprendizaje sabor-nutriente. Capaldi, Campbell, Sheffer y Bradford (1987) mostraron que las ratas preferían un sabor asociado con una solución de sacarina (clave gustativa) cuando se proporcionaba 30 minutos antes de la comida de mantenimiento (clave nutritiva), respecto a un sabor con sacarina que no precedía a la presentación de alimento. También comprobaron esta situación con diferentes azúcares como glucosa y también con grasas de alto poder nutritivo, obteniendo resultados similares. Así pues, que aumente la preferencia por un sabor previamente asociado con nutrientes

es un fenómeno evolutivamente importante, dado el retraso que se produce durante la alimentación entre el sabor de la comida y la digestión de los nutrientes que contenga.

En segundo lugar, Mehiel y Bolles (1988) quisieron examinar el aprendizaje de una asociación sabor-nutriente dando a sus ratas diferentes sustancias (con sabor a fresa o cereza) mezcladas con otras soluciones gustativas con un aporte calórico similar. Por ejemplo, la preferencia por un sabor asociado con etanol (sustancia calórica que posee un sabor desagradable para las ratas) fue tan grande como la preferencia mostrada por los sabores asociados con sustancias como el aceite de maíz o la sacarosa (nutritivas y con sabores agradables para las ratas) que poseen un poder calórico similar al etanol. Estos hallazgos sugieren que el desarrollo de la preferencia condicionada obedece a la formación de una asociación sabor-nutriente que, por otra parte, resulta más fuerte que la asociación sabor-sabor, al menos en ratas.

El tercer método para observar un aprendizaje sabor-nutriente consiste en administrar al animal el nutriente de forma contingente con el sabor, pero evitando la cavidad bucal. Se ha demostrado, en ratas, que la infusión intragástrica de nutrientes de modo contingente con el consumo de una solución gustativa incrementa la preferencia por el sabor de dicha solución (Sclafani, 1990). Esto significa que, puesto que no se experimenta el sabor en la cavidad oral, la preferencia formada no cabe atribuirle a una asociación sabor-sabor, sino más bien a los efectos derivados de la administración intragástrica de la solución gustativa, como su poder calórico o nutritivo. Sclafani y sus colaboradores han desarrollado una línea de investigación relacionada con las preferencias condicionadas mediante la infusión intragástrica de nutrientes, encontrando que la magnitud de la preferencia condicionada depende del

tipo de nutriente. Por ejemplo, parece que las infusiones de carbohidratos son más efectivas que las infusiones de otro tipo de nutrientes, como las grasas y las proteínas, a la hora de generar preferencias condicionadas por el sabor (Sclafani, 1990). De hecho, las infusiones intragástricas pueden incluso generar consecuencias aversivas en los sujetos bajo ciertas condiciones, como han encontrado algunos autores al utilizar este procedimiento de infusión (Deutch, Molina y Puerto 1976).

En humanos, por la naturaleza misma del proceso de alimentación, el aprendizaje sabor-nutriente parece ser el mecanismo de aprendizaje de preferencias condicionadas más habitual, aunque en la mayoría de ocasiones se pueden producir ambos aprendizajes, sabor-sabor y sabor-nutriente, al mismo tiempo. Como destaca Capaldi (1996), el aprendizaje sabor-nutriente produce preferencias por las comidas que tienen más calorías. En este sentido, parece que la densidad calórica es aún más importante que el número de calorías en sí. Esto se ha comprobado de forma experimental en ratas, observando que la preferencia por un sabor asociado con 2 gramos de una comida que contenía 4 calorías/gramo era mayor que la preferencia por otro sabor asociado con 4 gramos de otra comida que poseía 2 calorías/gramo (Bolles, Hayward y Crandall, 1981). La magnitud de calorías era equivalente pero las ratas, al igual que los humanos, parecen preferir alimentos en los que las calorías se presenten de forma más densa. Aquí parece jugar un papel importante la asociación sabor-sabor, dado que la mayoría de alimentos que poseen una densidad calórica alta son los alimentos ricos en grasas (que poseen 9 calorías/gramo frente a los carbohidratos y proteínas que aportan 4 calorías/gramo) y en consecuencia suelen tener una mayor palatabilidad. Como dice Capaldi (1996), de estos datos se podrían extraer pautas de actuación para promover la adquisición de hábitos alimentarios

sanos, como por ejemplo comer verduras (que suelen ser menos preferidas) acompañando a la carne (que suele ser más preferida y con un aporte calórico mayor). Esto incrementaría la preferencia por las verduras, ya que ambos tipos de aprendizaje, sabor-sabor y sabor-nutriente, pueden ocurrir cuando un sabor es mezclado con una comida. Sin embargo, cuando existe un cierto retraso entre las claves gustativa y calórica, tan solo el aprendizaje sabor-nutriente tendría lugar, razón por la cual las preferencias más fuertes parecen ocurrir cuando los sabores se presentan de forma conjunta y ambos mecanismos entran en acción. Desgraciadamente, en la vida diaria los alimentos suelen consumirse de forma secuenciada, dejando el postre para el final. Esta situación podría dar lugar a una cuestión interesante y es que, según lo que hemos visto, si comemos una ensalada y después un postre podríamos llegar a preferir más la ensalada por las calorías presentes en el postre. Capaldi alude entonces a lo que se llama “*el efecto postre*”, que nos dice que las consecuencias nutritivas y agradables de una comida parecen quedar asociadas al sabor del alimento consumido más cercano en el tiempo, aumentando la preferencia por éste último. Este fenómeno puede influir en la formación de hábitos alimentarios, ya que muchos padres prometen a sus hijos que si se comen la verdura (u otro alimento poco preferido), podrán comer después el alimento que les gusta (habitualmente el postre). La idea es que el alimento preferido, en base a un “*Principio de Premack*” alimentario, actúe como reforzador del menos preferido, que se consume antes. Lamentablemente, los resultados son precisamente los contrarios: se incrementa la preferencia por el alimento preferido y normalmente menos sano. En definitiva, quizá consigan que su hijo se coma hoy las espinacas, pero no conseguirán que le gusten más. En todo caso, en cuanto a gustos, el logro será que al niño le guste aún más el postre (García y Bach, 1999).

2.3. Aprendizaje sabor-sabor vs. Aprendizaje sabor-nutriente

Como hemos visto, en función de las sustancias que se utilicen, los diferentes mecanismos de aprendizaje propuestos pueden coexistir en el mismo paradigma. De esta forma, usando una solución de sacarosa como EI se podría obtener una preferencia basada en la palatabilidad del sabor, pero también una preferencia basada en las consecuencias post-ingesta del nutriente. Si esto es así, ambos tipos de preferencia deberían ser susceptibles de disociación. El uso de sustancias hedónicamente apetitivas sin valor nutricional, como la sacarina, ha permitido el estudio exclusivo de la preferencia basada en la palatabilidad, como muestran los estudios clásicos de Holman (1975). Por otro lado, también hemos resaltado el uso de la infusión intragástrica para posibilitar el estudio de la preferencia basada en nutrientes (Elizalde y Sclafani, 1990). Profundizando un poco más en esta cuestión, tal división no sólo implica procedimientos distintos, sino que también parece estar sustentada por procesos asociativos diferentes (Dwyer, 2005; Fedorchak y Bolles, 1987). Así pues, según las propiedades del EI podemos distinguir un proceso de aprendizaje basado en la evaluación sensorial de su sabor, que correspondería al mecanismo de aprendizaje sabor-sabor, pero también otro proceso basado en las expectativas de las consecuencias post-ingesta, que correspondería al mecanismo de aprendizaje sabor-nutriente (Capaldi, 1996), aunque esta distinción no es tan simple si nos centramos en los procesos implicados en cada asociación.

Se ha sugerido que el EC puede asociarse con diferentes propiedades del EI, como pueden ser el aspecto sensorial (en relación a los componentes gustatorios y olfatorios, por ejemplo), el componente hedónico (cuán atractivo es el EI) o sus propiedades motivacionales (como las calorías cuando el sujeto está hambriento),

dependiendo de factores como el grado de experiencia con los sabores, su naturaleza hedónica inicial o el intervalo temporal entre la experiencia con el sabor (EC) y sus consecuencias (EI) (Delamater, 2011, 2012). Cuando se usa un EI palatable, el sabor de la solución incluye propiedades sensoriales específicas (como el dulzor, por ejemplo), susceptibles de asociarse con el EC, tal y como han demostrado diversos estudios utilizando el procedimiento de devaluación del EI. Por ejemplo, Dwyer (2005), asoció un sabor de uva (EC) con una solución de glucosa al 2% de concentración (EI) y un sabor de cereza (EC) con otra solución de maltodextrina, también a una concentración del 2% (EI). Más tarde, uno de los EIs fue devaluado con una inyección de cloruro de litio (LiCl). En un test de elección de dos botellas posterior, las ratas evitaron el sabor asociado al EI que fue devaluado, pero no evitaron el otro sabor. Como resalta Dwyer, si los sabores se hubieran asociado simplemente con las propiedades hedónicas o motivacionales del reforzador, no se esperaría ninguna diferencia en la preferencia por algún sabor durante la prueba de elección, un dato que indica la formación de un tipo de asociación relacionada de forma directa con el mecanismo de aprendizaje sabor-sabor, donde la asociación se establecería entre el sabor de la solución EC y las propiedades sensoriales del sabor del EI.

Por otro lado, el EI también posee otro tipo de propiedades reforzantes, como las propiedades hedónicas positivas relacionadas con las respuestas afectivas que genera su consumo, que también pueden asociarse con el sabor EC. En este sentido, diversos estudios han evaluado con diferentes técnicas la separación de estos aspectos, más afectivos y emocionales, respecto de los aspectos sensoriales que acabamos de describir, debido a que ambas cualidades del EI pueden asociarse con el sabor del EC durante el condicionamiento. Para evaluar las diferencias que puedan

existir en las respuestas hedónicas condicionadas e incondicionadas a un sabor, existen diversas técnicas como el análisis del patrón de ingesta o consumo del fluido (*microstructural analysis of licking behaviour*, en la terminología inglesa) (Dwyer, 2008, 2012), así como el análisis de las respuestas orofaciales en el test de reactividad al sabor (Forestell y LoLordo, 2003; Grill y Norgren, 1978). Ambas técnicas se exponen de forma más detallada más adelante.

Finalmente, si además de utilizar una solución dulce y de alta palatabilidad como EI, la solución también es nutritiva, esta propiedad reforzante posibilita el establecimiento de una tercera asociación entre el sabor EC y las consecuencias nutritivas post-ingesta de la solución (Delamater, Campese, LoLordo y Sclafani, 2006). Esta tercera asociación también se ha comprobado con diferentes métodos como la infusión intragástrica de sustancias con cierto valor nutritivo, como se comprueba en la línea que Sclafani y sus colaboradores han desarrollado, haciendo que los animales experimenten las consecuencias calóricas post-ingesta de la solución nutritiva sin la oportunidad de experimentar su sabor de forma oral. Así pues, esta situación sólo permite un proceso asociativo sabor-nutriente como mecanismo explicativo de este tipo de aprendizaje.

En resumen, parece que las asociaciones relacionadas con las propiedades reforzantes del EI (asociaciones sabor-valor hedónico y sabor-nutriente) permiten establecer preferencias condicionadas que se basan en mecanismos de aprendizaje diferentes (Owens, Capaldi y Sheffer, 1993). En particular, la asociación sabor-valor hedónico estaría más relacionada con el mecanismo de aprendizaje sabor-sabor, mientras que la asociación sabor-nutriente estaría más relacionada, lógicamente, con el mecanismo de aprendizaje sabor-nutriente. Ambos mecanismos deberían ser

entonces independientes. Si para distinguir el aprendizaje sabor-sabor del aprendizaje sabor-nutriente tomamos en consideración el papel que juegan tanto la expectativa de las consecuencias post-ingesta como la relación de contingencia EC-EI, podríamos explicar la preferencia condicionada en base a estos términos. La idea central es que, en el aprendizaje sabor-nutriente, los animales aprenden que el sabor EC es una señal de las consecuencias nutritivas post-ingesta, es decir, estaría más relacionado con un aprendizaje de tipo predictivo, en base a las expectativas y sensible a cambios en la relación de contingencia EC-EI. Sin embargo, en el aprendizaje sabor-sabor, el sabor EC no se comportaría como una señal de palatabilidad, sino que se produciría una transferencia de las propiedades del sabor del EI hacia el sabor EC, relacionándose más bien con un aprendizaje de tipo no predictivo, más sensorial y sensible a variaciones de la contigüidad temporal, más que cambios en la relación de contingencia de los eventos (Drucker, Ackroff y Sclafani, 1994).

2.4. Otras consideraciones sobre el paradigma de preferencia condicionada

Una vez vistos los diferentes mecanismos asociativos en los que se basa este paradigma, si nos centramos en la naturaleza de los ECs que se pueden emplear podemos encontrar diferentes variaciones. Por un lado, la mayoría de trabajos sobre preferencia condicionada suelen emplear como EC sabores simples, mezclas de varios sabores o incluso olores. Se han obtenido preferencias con sabores básicos como salado, ácido, amargo y dulce (Drucker et al., 1994), aunque lo habitual con este tipo de sabores es utilizarlos como EI (Fanselow y Birk, 1982). Las mezclas de sabores o sabores complejos, como los saborizantes comerciales mezclados con sacarina o con sacarosa, también son habituales en experimentos sobre preferencia condicionada con

este paradigma (Ackroff, Dym, Yiin y Sclafani, 2009; Ackroff, Lucas y Sclafani, 2005; Tarner et al., 2004). Así mismo, también se pueden utilizar claves olfatorias como estímulos condicionados (ver Torquet et al., 2014) ya que multitud de preferencias olfatorias parecen adquirirse también en base a la experiencia.

En cuanto a la naturaleza del EI, se han utilizado tanto sabores palatables (Holman, 1975) como nutrientes específicos, entre los que destacan los carbohidratos, las grasas, las proteínas o el alcohol (ver revisión de Sclafani, 1999), observándose en ambos casos preferencias condicionadas al sabor y determinando, como ya hemos explicado, los diferentes mecanismos asociativos de aprendizaje, sabor-sabor y sabor-nutriente.

Por otra parte, el paradigma de preferencia condicionada por el sabor puede diferir también en función de aspectos procedimentales, como la modalidad de administración del EI. La línea de investigación de Sclafani y colaboradores es ilustrativa acerca del método de administración de nutrientes a través de una sonda mediante infusión intragástrica, tras haber consumido un sabor determinado (Myers y Sclafani, 2001, 2003). De la misma forma, se han realizado infusiones con el propósito de administrar nutrientes de forma intrayeyunal (Ackroff, Yiin y Sclafani, 2010), intraduodenal (Drucker y Sclafani, 1997) o vía portal-hepática (Tordoff y Friedman, 1986). En estos casos, el sabor que la solución nutritiva pudiera poseer no debería interferir en la asociación entre sus consecuencias reforzantes post-ingesta y el sabor que se pretende condicionar, dado que la solución nutritiva evitaría la cavidad bucal y orofaríngea. Sin embargo, el método más simple y natural para adquirir una preferencia condicionada por un sabor consiste en proporcionar de forma oral el EI, sea éste un nutriente o una solución palatable, ya que ésta es la situación más habitual

que se produce cuando los animales se alimentan. En este sentido, cuando se utiliza el método de administración oral, el procedimiento simultáneo es el que se emplea con más frecuencia en este paradigma de aprendizaje (Mehiel y Bolles, 1988). Mediante este procedimiento, el EC y el EI se administran mezclados en una solución conjunta, formando un compuesto. Por otro lado, también se pueden conseguir fuertes preferencias condicionadas con un procedimiento demorado, donde la clave gustativa va seguida de la presentación del EI tras un cierto intervalo de tiempo (Holman, 1975). Este autor destacó que las ratas desarrollaban preferencia por un sabor cuando iba seguido 30 minutos después de una solución de glucosa, pero no la desarrollaban si la solución que se presentaba más tarde era de sacarina. Sin embargo, mostraban una fuerte preferencia cuando la sacarina se presentaba inmediatamente después o mezclada con el propio sabor. Los resultados sugieren que la preferencia basada en el sabor ocurre sólo si no existe retraso entre el sabor del EC y el sabor del EI, o si el intervalo entre los sabores es muy breve, mientras que las preferencias basadas en los efectos post-ingestivos pueden ocurrir aun cuando exista un cierto retraso entre el sabor del EC y el nutriente del EI (Elizalde y Sclafani, 1988). Se han obtenido preferencias significativas incluso cuando el intervalo entre la exposición a la clave gustativa y el nutriente varía entre 1 y 5 horas (Capaldi y Sheffer, 1992). Esta capacidad para adquirir preferencias basadas en los nutrientes cobra mucho sentido si lo entendemos en términos fisiológicos como un proceso análogo a la ingestión y digestión, entre las que también existe un intervalo temporal.

Por otro lado, el estado motivacional de los sujetos experimentales también juega un papel importante en la preferencia condicionada por el sabor usando este paradigma. Así pues, los animales pueden ser entrenados o sometidos a prueba bajo

diferentes programas o niveles de privación de comida y/o agua. Aunque la privación de agua también reduce el consumo de alimento (Bolles, 1961), la privación de comida podría facilitar el condicionamiento del sabor cuando se usan nutrientes como EI. En este sentido, el incremento de la necesidad energética de los animales podría potenciar el valor reforzante del nutriente (Davidson, 1998). Respecto a las preferencias basadas exclusivamente en el sabor, el estado motivacional en este caso no parece ser una variable influyente (Fedorchak y Bolles, 1987). Estos autores examinaron en ratas cómo influye el nivel de privación de comida en la preferencia por un sabor emparejado con sacarina o con sacarosa. Cuando se realizaba la prueba bajo privación de alimento se producía una fuerte preferencia por el sabor que se había emparejado con la sacarosa. Así mismo, esta preferencia se veía reducida cuando los animales realizaban el test después de 24 horas de acceso libre a la comida. Sin embargo, este efecto no se encontró cuando se utilizó sacarina como EI, apreciándose una preferencia similar por el sabor emparejado con la sacarina independientemente del nivel de privación de los animales durante el test. Además, bajo privación de alimento, la extinción de la preferencia condicionada parece producirse con mayor celeridad (Harris et al., 2004). Estos autores, manipulando el nivel de hambre de las ratas durante la prueba, demostraron que la preferencia por un sabor emparejado con sacarosa durante el entrenamiento descendía tras presentaciones no reforzadas del mismo en animales hambrientos, a diferencia de la preferencia mostrada por animales saciados. Dado que el sabor emparejado con sacarosa formaría distintos aprendizajes (sabor-sabor y sabor-nutriente) y que el estado de privación de comida durante el test parece seleccionar el mecanismo sabor-nutriente, el decremento en la preferencia condicionada sólo en animales hambrientos durante el test proporcionó evidencia de

que la presentación del sabor no reforzado parece ser más efectiva en la preferencia basada en el aprendizaje sabor-nutriente que en el aprendizaje sabor-sabor.

Otro factor que puede determinar el curso de la preferencia condicionada es la valoración hedónica inicial del sabor. Por ejemplo, se ha observado que la experiencia repetida con un sabor preferido de forma innata, como el sabor dulce, provoca un incremento cuantitativo en su valoración hedónica. Sin embargo, en el caso de sabores inicialmente desagradables, como el sabor amargo de la quinina, no está claro que pueda producirse un cambio cualitativo de desagradable a agradable en su valor hedónico (Myers y Sclafani, 2003).

Respecto a los diferentes diseños utilizados en este paradigma, en los diseños intra-sujeto los animales recibirían dos tipos diferentes de ensayos durante el condicionamiento: ensayos reforzados en los que un sabor (EC+) sería emparejado con el EI y ensayos no reforzados en los que un segundo sabor (EC-) se presentaría en ausencia del EI (o emparejado con otro EI diferente). El resultado del condicionamiento se suele medir mediante un test de dos botellas que contienen los dos sabores utilizados (EC+ vs. EC-). Sin embargo, esta medida del condicionamiento ha sido cuestionada (p.ej., Delamater, 2007) dado que no descartaría de forma definitiva que la preferencia obtenida por el EC+ fuese parcialmente debida a una evitación aprendida del EC-, el cual ha sido explícitamente no emparejado con el EI (Harris et al., 2004). En los diseños entre-grupos nos encontraríamos con una situación parecida, ya que estos diseños suelen utilizar grupos que reciben diferentes condiciones durante el entrenamiento. En la condición emparejada se presentaría el sabor (EC) junto con la solución palatable y/o nutritiva (EI), mientras que en la condición desemparejada se presentarían los mismos estímulos pero en diferentes días. La utilización del mismo

sabor en ambas condiciones podría ofrecernos una medida más fiable, a través de la condición desemparejada, acerca de la “línea base” de consumo del sabor que también se estaría utilizando como EC en la condición emparejada, lo que nos ofrecería un mayor control que los diseños intra-sujeto pero, al igual que en éstos, algunos autores indican que la contingencia negativa entre el sabor y el EI en la condición desemparejada podría tener el potencial suficiente para producir un aprendizaje inhibitorio (si hay sabor, entonces no habría EI) que podría reducir la preferencia por el sabor (Albertella y Boakes, 2006). Para solucionar esto, podríamos pensar en otro tipo de control que podría consistir en el uso de un grupo al que se le ofrece el consumo del sabor en cuestión, por simple exposición. Nuevamente, este último grupo nunca podría ser un control satisfactorio, ya que estos sujetos no tendrían experiencia con el EI respecto al grupo emparejado; por lo tanto, las diferencias entre las condiciones podrían atribuirse a diferencias en la experiencia con la solución palatable y/o nutritiva que se utilizase como EI.

En cualquier caso, la preferencia condicionada al sabor se ha estudiado usando una gran variedad de estímulos y métodos. Las preferencias por un sabor neutro pueden estar asociadas tanto al sabor palatable de una sustancia (nutritiva o no) como a las acciones post-ingesta de un nutriente. En ambos casos se observa una adquisición rápida, aunque sólo la expresión de la preferencia basada en nutrientes se ve potenciada por la privación de comida. Finalmente, la forma de medir dicha preferencia condicionada al sabor es importante, siendo el test de elección de dos botellas (EC+ vs. EC-) un procedimiento que podría presentar algún problema de interpretación en función de las diferentes condiciones de control.

Capítulo 3

Medida de las preferencias gustativas

Un factor que quizás no ha sido exhaustivamente estudiado pero que podría resultar relevante a la hora de determinar la naturaleza de los mecanismos asociativos que intervienen en el condicionamiento de preferencias gustativas, es el tipo de prueba empleada para evaluar la magnitud de la preferencia. De forma convencional, la bibliografía nos muestra la utilización recurrente de pruebas en las que se registra el consumo de la solución gustativa, de forma aislada, frente a agua o frente a un sabor alternativo. Pero, como ya se ha mencionado, existen diferentes mecanismos asociativos a través de los cuales puede establecerse una preferencia gustativa, por lo que se hace necesaria la utilización de determinadas técnicas que evalúen “algo más” que el consumo propiamente dicho, que podría también estar determinado por variables como el estado motivacional del organismo o la naturaleza del sabor empleado.

Dado que esta tesis doctoral se centra en el análisis de los cambios hedónicos (o cambios en la palatabilidad de los fluidos) producidos durante el aprendizaje de preferencias por los sabores, conviene mencionar aquí dos técnicas que de modo específico se han desarrollado para examinar la valoración hedónica de los sabores durante el condicionamiento de aversiones y de preferencias gustativas. Se trata del análisis del patrón de ingesta (licking behaviour) y la técnica de reactividad al sabor. Esta última técnica, junto con la prueba típica de consumo o ingesta, son los procedimientos empleados en este estudio experimental. A continuación se realiza un repaso más detallado de las diferentes técnicas empleadas para estimar el condicionamiento de preferencias y aversiones gustativas.

3.1. Pruebas de consumo

Para medir la magnitud del aprendizaje gustativo, tanto en el caso de las preferencias condicionadas por los sabores como de las aversiones, la mayor parte de las investigaciones al respecto han empleado, de forma habitual, dos tipos de pruebas de consumo (Bures, Bermudez-Rattoni y Yamamoto, 1998).

3.1.1 Prueba de exposición a un solo fluido

En esta prueba está disponible para el animal una botella con el sabor EC que fue emparejado con el EI durante el condicionamiento. Su consumo se compara con el de un grupo control que ha recibido el sabor EC sin la presentación del EI (o que lo ha recibido de forma no contingente). Otra opción alternativa sería comparar el consumo del sabor EC con el consumo de agua durante los días de habituación (fase previa al condicionamiento en la cual los animales beben diariamente, en tubos calibrados, para habituarlos a la metodología utilizada). La principal limitación de este procedimiento es que, cuando la preferencia o la aversión condicionada es débil, el programa de privación puede hacer que los animales beban el fluido igualmente, al disponer de una sola opción. En la misma línea, cuando se desarrolla una fuerte preferencia o aversión por el sabor durante el condicionamiento, es probable que las diferencias en la magnitud del aprendizaje se vean oscurecidas en la prueba por los efectos denominados “techo” y “suelo”. Esto es, que los sujetos beban el máximo de fluido disponible si hablamos de preferencia o que, por el contrario, se elimine totalmente el consumo si la aversión es fuerte. Una posible solución a este problema sería analizar la resistencia a la extinción o utilizar el procedimiento de elección de dos o más botellas.

3.1.2. Prueba de elección entre dos fluidos

Siguiendo las pautas de los trabajos pioneros de Ritcher y Campbell (1939) con roedores, se presentan simultáneamente dos botellas con un contenido diferente. El animal, generalmente, tiene la oportunidad de escoger entre agua destilada (u otro sabor alternativo) y el fluido que fue asociado al EI durante la fase de entrenamiento, registrando su consumo. Sin embargo, esta prueba también tiene alguna limitación. En los procedimientos de preferencia condicionada que utilizan más de un sabor como ECs, sabiendo que la mayor preferencia por el EC+ puede deberse, en parte, a una evitación aprendida del sabor EC-, metodológicamente hablando también podría ocurrir lo que se llama *“efecto de preferencia de lado”* (Simmen, Pasquet y Hladik, 2004), por la presentación del fluido condicionado siempre en el mismo lado de la caja. Para evitar esta situación, la posición de las botellas debería variar alternativamente y de forma contrabalaceada a lo largo de los ensayos, tanto en la fase de condicionamiento como en la fase prueba. Por otro lado, podría darse el caso en el que los animales escogieran una botella al azar y continuaran bebiendo de ella sin probar la alternativa (en aprendizajes gustativos no muy intensos y concretamente en los procedimientos de condicionamiento de preferencias en los que se utilizan sabores apetitivos en lugar de sabores neutros o moderadamente aversivos). Una solución a este problema pasaría por colocar, de manera igualmente accesible, botellas con los sabores intercalados pero limitadas en cantidad, con la intención de que tengan que beber de varias botellas para saciarse. Algunos autores han estudiado si la utilización de más de 2 botellas podría resultar beneficiosa a la hora de estimar la preferencia, encontrando mejores resultados con 3 botellas que con 2, pero sólo si la solución condicionada está presente en 2 de las 3 botellas disponibles, conteniendo agua la

botella restante (S-A-S). Este resultado parece lógico, dada la existencia de una mayor disponibilidad de la solución condicionada que de agua (o solución alternativa). De hecho, si se invierte el procedimiento y se proporcionan 2 de las botellas con agua y tan solo 1 con la solución condicionada (A-S-A), los resultados no mejoran los del test de 2 botellas convencional. Además, para condicionar soluciones moderadamente aversivas, como por ejemplo el ácido cítrico, ni siquiera la mayor disponibilidad de la solución condicionada parece ser más efectiva (Tordoff y Bachmanov, 2003). De la misma forma, estos autores indican que la utilización de 6 botellas (3 con la solución condicionada y 3 con agua) tampoco fue mejor que el test convencional de 2 botellas. Así pues, dado que utilizar más de 3 botellas parece inefectivo, unido a que en nuestra línea de investigación también se utiliza ácido cítrico como sabor EC y entendiendo, además, que la disponibilidad relativa de la solución al utilizar 3 botellas parece un sesgo importante, en esta tesis se ha optado por la utilización del test 2 botellas, alternando el lado de presentación para evitar el efecto de preferencia de lado.

Al margen de las diferentes modalidades de pruebas de consumo existentes, cuando se desarrolla una preferencia condicionada por un sabor, existe también un componente emocional o afectivo que nos informa del valor hedónico de las soluciones implicadas en el procedimiento. Sin embargo, las pruebas de consumo que acabamos de describir pueden no reflejar adecuadamente la valoración hedónica de los fluidos proporcionados a los animales, al igual que sucede en el caso de una aversión condicionada al sabor. Para analizar esta asociación sabor-valor hedónico en base a las respuestas hedónicas condicionadas e incondicionadas a un sabor, surgen otro tipo de técnicas más sofisticadas como el análisis de las respuestas orofaciales en el test de reactividad al sabor y el análisis del patrón de ingesta o consumo.

3.2. Prueba de reactividad al sabor

Los cambios producidos en la valoración hedónica de los fluidos tras el condicionamiento pueden detectarse de forma muy fiable examinando las reacciones orofaciales de aceptación y de rechazo que muestran los animales cuando se les infunde un sabor directamente en la cavidad bucal a través de una cánula implantada para este fin, una técnica denominada prueba de reactividad al sabor (Grill y Norgren, 1978). Tradicionalmente, esta prueba ha dado muy buenos resultados a la hora de evaluar los cambios hedónicos que se producen en el aprendizaje aversivo gustativo, razón por la cual se hace necesaria su introducción aludiendo a estos términos.

En el aprendizaje aversivo gustativo, la reducción en la ingesta de un sabor asociado previamente con un agente emético o inductor de náusea, como el cloruro de litio (LiCl), se ha considerado un índice fiable del condicionamiento de la aversión. Sin embargo, se puede observar una reducción similar en el consumo del sabor tras su emparejamiento con drogas reforzantes sin que, por el contrario, cambie su valoración hedónica (Parker, 1982, 1995 y 2003; ver Verendeev y Riley, 2012, para una revisión de la aversión al sabor con drogas reforzantes). En este sentido, cuando la aversión al sabor está mediada por el condicionamiento de náusea, además de la reducción en el consumo tendría lugar también un cambio en la palatabilidad o valoración hedónica de la solución condicionada que podría estimarse a partir de las reacciones orofaciales características del rechazo de una solución gustativa (Parker, 2014). Sin embargo, al contrario que las drogas eméticas, diferentes drogas con propiedades reforzadoras (como la cocaína o las anfetaminas) no producen en la rata este tipo de respuestas de rechazo, evitando el sabor como resultado de una respuesta condicionada de miedo, ya que las ratas evitan consumir cualquier sustancia relacionada con un cambio en su

estado fisiológico interno (Lin, Arthurs y Reilly, 2014; Parker, Limebeer y Rana, 2009). Esta disociación en cuanto a los procesos que subyacen al aprendizaje aversivo gustativo, *evitación* del sabor y *aversión* propiamente dicha, ha sido posible mediante el estudio de la valoración hedónica de los sabores (Parker, 2014 para una revisión reciente). Para este fin, se hace necesario matizar que las pruebas convencionales de consumo requieren, según Konorski (1967), de dos tipos de conductas, preparatorias (o de aproximación al tubo con la bebida) y consumatorias (o de ingesta del fluido). Dado que cuando el animal evita consumir el fluido (esto es, no se aproxima al tubo que contiene la bebida), éste no realiza respuesta consumatoria alguna, se hace necesaria la utilización de una prueba que mida específicamente las respuestas consumatorias. El test de reactividad al sabor (Grill y Norgren, 1978) permite evaluar los cambios que se producen en la palatabilidad de los fluidos como consecuencia de su administración forzada. En esta prueba, se miden las reacciones orofaciales que produce una solución cuando se infunde directamente en la cavidad bucal a través de una cánula implantada a la rata (Parker, 1980). Cuando una solución agradable, como la sacarosa, se infunde directamente en la cavidad bucal de las ratas, éstas muestran reacciones de ingesta o aceptación entre las que destacan los movimientos rítmicos de la boca, el lameteo de las patas delanteras y las protrusiones de la lengua (Berridge, 2000; Berridge y Grill, 1983 y 1984). Sin embargo, cuando la solución infundida ha sido emparejada con un estado de náusea, muestran reacciones de rechazo, similares a las producidas por sustancias desagradables como la quinina, de las cuales las más características son las arcadas, las sacudidas de la cabeza o el frotamiento de la barbilla con las paredes o con el suelo de la jaula experimental (Grill, 1985). Ambos tipos de respuestas son comunes en multitud de especias, encontrándose patrones

conductuales similares tanto en bebés humanos, como en primates y roedores (Steiner, Glaser, Hawilo y Berridge, 2001). Incluso se han encontrado patrones similares en otros animales como los caballos (Jankunis y Whishow, 2013) o los gatos (Van den Bos, Meijer y Spruit, 2000) y llegando a establecer patrones conductuales en términos de reactividad al sabor en otros animales, como. En la Figura 1 se puede observar un ejemplo del tipo de reacciones que acabamos de comentar.

Figura 1. Reacciones apetitivas y aversivas universales



Nota. (A) Reacciones orofaciales universales apetitivas o de aceptación (protrusiones de la lengua) ante un sabor dulce y (B) Reacciones orofaciales universales aversivas o de rechazo (arcadas) ante un sabor amargo (de Berridge, 2000).

Se han realizado algunos estudios con la técnica de reactividad facial para examinar el aprendizaje de preferencias gustativas en roedores. Por ejemplo, Myers y Sclafani (2001), con el procedimiento de administración intragástrica de glucosa, constataron una preferencia por un sabor asociado con la infusión de glucosa y un aumento de las respuestas hedónicas cuando se infundía dicho sabor directamente en la boca de los animales. En línea con lo anterior, en uno de los estudios pioneros sobre cambios en la palatabilidad, Pelchat, Grill, Rozin y Jacobs (1983) analizaron cómo variaban los patrones de reactividad facial tras emparejar una solución de sacarosa con 3 estímulos diferentes: cloruro de litio, una descarga eléctrica aplicada a las patas del animal o lactosa. La primera vez que la sacarosa se infundió de forma intraoral, las ratas mostraron conductas de ingesta de la solución (principalmente movimientos rítmicos de la boca y protrusiones de la lengua). Después de la infusión y de forma contingente, se administró a cada animal uno de los tres estímulos incondicionados. Tras un único ensayo de condicionamiento, las ratas a las que se les administró una descarga eléctrica o lactosa, siguieron mostrando reacciones apetitivas cuando se les infundía la sacarosa. Sin embargo, las ratas que habían recibido litio disminuyeron las reacciones apetitivas y realizaron respuestas de disgusto (arcadas, frotamientos de la barbilla y sacudidas de la cabeza). Así pues, éste y otros trabajos han permitido observar, con el test de reactividad al sabor, aspectos tan dispares como el cambio en la palatabilidad de la sacarosa como consecuencia de las asociaciones establecidas durante el condicionamiento (Forestell y Lolordo, 2003), las diferencias sexuales existentes en cuanto a la preferencia por la sal (Flynn, Schulkin y Havens, 1993), así como el cambio en el patrón de respuestas hedónicas tras el consumo voluntario de sacarosa en ratas con diferentes edades (Willmouth y Spear, 2009).

3.3. Análisis del patrón de ingesta

Con el propósito de evaluar la valoración hedónica de las sustancias se ha desarrollado también otra técnica centrada en el análisis del patrón de ingesta o microestructura de la respuesta consumatoria (Davis, 1989; Dwyer, 2012). Las ratas, cuando ingieren un fluido, lamen de la botella que lo contiene con una frecuencia o cadencia determinada. Si tomamos en consideración la pausa o intervalo entre las sucesivas respuestas de lametear o lametones, estas respuestas tienden a producirse en conjuntos o grupos (*cluster*, en inglés). El número de respuestas por agrupación (tamaño del clúster), depende de la naturaleza hedónica de la solución. Si se trata de una solución agradable, como la sacarina, el tamaño del clúster está positivamente relacionado con su concentración, es decir, aumenta cuanto mayor es la concentración de la solución endulzada. Por el contrario, el tamaño del clúster decrece cuando se consumen sustancias aversivas como la quinina (Davis y Smith, 1992) y también soluciones dulces que han sido condicionadas aversivamente. Sin embargo, este patrón de respuestas de lamer no está relacionado directamente con el consumo de la solución, ya que el mayor consumo de una solución dulce se produce a concentraciones moderadas de la solución.

Basándonos en lo anterior, el análisis de la frecuencia de las respuestas de lamer (microestructura de la respuesta) constituye una medida alternativa al test de reactividad al sabor para evaluar la valoración hedónica de las soluciones (Dwyer, 2012). De hecho, esta técnica resulta especialmente indicada para diferenciar los procesos de evitación de un sabor (por su asociación, por ejemplo, con una droga reforzadora) y la aversión condicionada con sustancias eméticas o inductoras de náusea. Cuando un sabor dulce se asocia con los efectos de una droga emética, el

tamaño del clúster y el consumo de la solución disminuyen. Sin embargo, cuando se asocia el sabor con una droga con propiedades reforzadoras, el consumo de la solución disminuye pero el tamaño del clúster permanece inalterado (Dwyer, Boakes y Hayward, 2008). Al igual que se comprueba en el test de reactividad, las drogas a dosis reforzantes no provocarían aversión al sabor pero sí evitación de la solución gustativa.

Las investigaciones con el paradigma de preferencia condicionada por el sabor también demuestran la utilidad de esta técnica para medir cambios en la palatabilidad de los fluidos. Dwyer (2008) realizó una serie experimental utilizando este paradigma para demostrar cómo podía variar el tamaño del clúster sin que el consumo se viese alterado. Para ello, emparejó un sabor con una solución de maltodextrina al 16% (CS+) y otro sabor con la misma solución pero al 2% (CS-). En la prueba, se presentaron ambos sabores emparejados con las diferentes concentraciones de maltodextrina (16% y 2%). Analizando los resultados, observó un mayor consumo del sabor CS+ frente al sabor CS-, pero solo cuando los sabores se presentaban con una concentración del 2% de maltodextrina (con maltodextrina al 16% no hubo diferencias). Sin embargo, el tamaño del clúster siempre fue mayor para el sabor CS+, independientemente de la concentración con la que se presentaban los sabores. Como ya comentamos, el consumo de una sustancia dulce o agradable depende de su concentración. En este sentido, el consumo de una solución dulce se incrementa al aumentar su concentración hasta un límite por encima del cual la ingesta disminuye (esto es, sigue una función en forma de U invertida). En cambio el tamaño del clúster aumenta de forma lineal con el incremento de la concentración de la solución. Presentar en la prueba una clave condicionada con maltodextrina junto con la presentación de la maltodextrina por sí misma, afectó al consumo de los sabores a bajas dosis, pero no a

concentraciones más altas, mientras que el patrón de ingesta se vio afectado a cualquier concentración. Estos resultados sugieren que en el condicionamiento de una preferencia aumenta la valoración hedónica del sabor CS+, justo lo contrario a lo que ocurre en el aprendizaje aversivo gustativo, donde se observa una disminución de la valoración hedónica del sabor condicionado. Así pues, tanto el test de reactividad al sabor como el análisis de la del patrón de ingesta parecen técnicas idóneas para evaluar la valoración hedónica o palatabilidad de los sabores durante el condicionamiento de preferencias gustativas.

Parte II

Estudio experimental

Capítulo 4

Objetivos de la investigación

Esta tesis doctoral tuvo como objetivo principal examinar con el paradigma de preferencia condicionada por el sabor en ratas los cambios que se producen en la valoración afectiva o palatabilidad de los fluidos tras el condicionamiento de una preferencia gustativa. Para ello, tras evaluar mediante una prueba de consumo el desarrollo de la preferencia adquirida por un sabor, por su asociación previa con una solución reforzante, se analizaron con la técnica de reactividad al sabor las reacciones oro-faciales de aceptación y/o rechazo del fluido como índice de su valor hedónico o afectivo. Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1º) Examinar con la técnica de reactividad al sabor las preferencias gustativas condicionadas con sustancias ricas en nutrientes, como sacarosa y maltodextrina (un polímero de glucosa) y con sustancias de elevada palatabilidad pero sin valor nutritivo o calórico como sacarina. Se desea contrastar, mediante el análisis de las respuestas orofaciales, si el cambio en la valoración hedónica del sabor tras el condicionamiento de la preferencia obedece a su asociación con las cualidades sensoriales específicas del reforzador, como su dulzor (un tipo de aprendizaje o asociación sabor-sabor), o con la anticipación de sus propiedades reforzantes o nutritivas (aprendizaje sabor-nutriente). La hipótesis de partida es que la combinación de un sabor novedoso (de baja palatabilidad como el ácido cítrico) ya sea con sacarina (a través de la asociación sabor-sabor), con maltodextrina (por la asociación sabor-nutriente) o con sacarosa (participando ambos procesos de aprendizaje) será suficiente para generar una preferencia condicionada por ese sabor en términos de consumo de la solución frente a un sabor alternativo. De ser correcta esta hipótesis, si el incremento en la valoración hedónica de la solución está más relacionado con los aspectos sensoriales del reforzador que con sus cualidades nutritivas, se debería producir también un aumento

de las respuestas apetitivas ante la infusión del sabor en la prueba de reactividad cuando dicho sabor se asoció con sacarina o sacarosa, pero no en el caso de la maltodextrina, una solución nutritiva sin la cualidad de dulzor. Por el contrario, si lo que hace más hedónicamente atractivo al sabor es su asociación con un reforzador con valor nutritivo, en ese caso el aumento de las respuestas apetitivas debiera producirse cuando se combina el sabor con las soluciones de maltodextrina y sacarosa, pero no con sacarina. La primera serie experimental de la tesis doctoral (Experimentos 1, 2 y 3) fue diseñada para probar esta hipótesis con cada una de las sustancias seleccionadas (sacarina, sacarosa y maltodextrina), además de evaluar la eficacia de la prueba de reactividad al sabor para detectar cambios en la valoración hedónica de los fluidos durante el condicionamiento de preferencias gustativas.

2º) Observar la influencia que ejerce sobre una preferencia gustativa la devaluación de la solución reforzante tras el condicionamiento de la preferencia. La técnica de devaluación permite reducir las propiedades hedónicas de la solución por su asociación con sustancias inductoras de náusea como cloruro de litio (LiCl). En este caso, al devaluar las distintas soluciones reforzantes con las que se ha instaurado la preferencia condicionada (sacarina, sacarosa y maltodextrina), se plantea como hipótesis que el efecto de la devaluación del reforzador podría transferirse al sabor previamente condicionado dependiendo de la naturaleza de la solución devaluada y reflejarse tanto en las pruebas de consumo como en la prueba de reactividad al sabor. En este caso, si el cambio en el valor hedónico del sabor está determinado por el componente sensorial del reforzador, deberíamos observar un descenso en las reacciones apetitivas al sabor condicionado sólo cuando las soluciones de sacarina y sacarosa se emparejan con el sabor durante el condicionamiento de la preferencia,

pero no en la condición de maltodextrina. Sin embargo, si las respuestas hedónicas se relacionan con el aspecto motivacional derivado del componente nutritivo de las soluciones, debería producirse un descenso en este tipo de repuestas hacia el limón cuando se devalúan la sacarosa y la maltodextrina, pero no la sacarina. Por otro lado, el procedimiento de devaluación debería tener el potencial suficiente para generar una aversión (tanto hacia las sustancias devaluadas directamente como hacia el sabor emparejado con ellas), un efecto que debería observarse tanto a nivel de consumo de la solución como de las respuestas aversivas que produzca durante su infusión en la prueba de reactividad. La segunda serie experimental de la tesis (Experimentos 4, 5 y 6) evalúa esta cuestión, el efecto de la devaluación del reforzador (sacarina, sacarosa y maltodextrina) sobre la preferencia previamente establecida por el sabor asociado y las reacciones hedónicas que evoca esta solución en la prueba de reactividad.

3º) Finalmente, otra de las variables que podrían influir en la adquisición y expresión de la preferencia condicionada por un sabor es su valor hedónico o palatabilidad inicial, es decir, apetitivo o aversivo. Para evaluar esta cuestión se ha propuesto la utilización de diferentes saborizantes no edulcorados para observar si el desarrollo de la preferencia condicionada, utilizando sabores hedónicamente positivos desde un principio, se produce en los mismos términos y condiciones que cuando se utilizan sabores moderadamente aversivos, como la solución de limón empleada como estímulo condicionado en las dos primeras series de experimentos. Para ello, en esta última serie (Experimentos 7, 8, y 9) se examina la adquisición de una preferencia gustativa con sabores inicialmente apetitivos (uva y cereza) asociados con sacarina, sacarosa y maltodextrina, como solución reforzante, para promover la preferencia condicionada y determinar los mecanismos asociativos (sabor-sabor y sabor-nutriente)

responsables de este aprendizaje. Si el valor hedónico inicial del sabor influyese en los cambios hedónicos generados por el condicionamiento, esta variable no debería afectar al consumo de la solución durante el desarrollo de la preferencia dado que las soluciones empleadas como reforzadores (sacarina, sacarosa y maltodextrina) poseen idéntico potencial para generar una preferencia condicionada por los sabores en cuestión (uva o cereza). Sin embargo, podría tener cierto efecto a la hora de evaluar las respuestas apetitivas ante los sabores en la prueba de reactividad. Aun así, sería de esperar, como en los estudios anteriores, un aumento en la valoración afectiva de los sabores cuando se asocian con una solución nutritiva como sacarosa y maltodextrina, pero no en el caso de su emparejamiento con sacarina. Finalmente, el Experimento 10 pondrá a prueba el efecto de la devaluación de cada componente de la solución reforzante por separado, desarrollando una preferencia por un sabor de uva o cereza utilizando sacarosa como estímulo incondicionado y observando más tarde cómo influye la devaluación del componente sensorial o gustativo del reforzador sacarosa (devaluando la sacarina), de su componente nutritivo (devaluando la maltodextrina) o de ambos aspectos (devaluando directamente la solución de sacarosa). La hipótesis es que, si la preferencia condicionada formada durante el entrenamiento con sacarosa está mediada por ambos procesos de aprendizaje (sabor-sabor y sabor-nutriente), al devaluar cada uno de los componentes de la asociación por separado el efecto debería observarse en las tres condiciones de devaluación en términos de consumo, esto es, una reducción en la cantidad ingerida del sabor previamente condicionado, pero el patrón de reacciones orofaciales mostradas en la prueba de reactividad dependería de la naturaleza del componente, sensorial o nutritivo, devaluado.

Capítulo 5

Material y método general

Dado que todos los estudios incluidos en esta tesis emplean el paradigma de aprendizaje de preferencia condicionada por el sabor, hay una serie de aspectos metodológicos comunes a todos ellos, por lo que en este apartado se expone el procedimiento general reservando las particularidades metodológicas de cada estudio para la sección del método de la parte experimental de la tesis.

5.1. Sujetos experimentales

Los sujetos empleados en el estudio experimental fueron ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*), con una edad comprendida entre dos y tres meses al comienzo de los experimentos. Los animales fueron criados en el Bioterio de la Universidad de Oviedo. A su llegada al laboratorio, se estabularon de individualmente en jaulas de polipropileno estándar (35 x 20 x 19 cm), con el suelo y las paredes transparentes y con el techo formado por una rejilla de aluminio. El suelo de las cajas estaba cubierto de serrín absorbente. Se controló la temperatura ambiente (21°C) y el ciclo de luz/oscuridad (12-12 horas) de la habitación donde estaban alojados los animales. Todos los experimentos se realizaron durante la fase de luz del ciclo, en horario de mañana. Las ratas fueron sometidas a un programa de privación de agua durante todos los experimentos, dándoles acceso a la misma en botellas de cristal durante 60 minutos diarios, 1 hora después de finalizar las sesiones experimentales. Todos los procedimientos experimentales se realizaron atendiendo a las directrices del Consejo Europeo (European Council Directive 86/609/EEC) y a la normativa española concerniente al uso de animales para la experimentación (RD-12301/2005).

5.2. Intervención quirúrgica e implante de cánulas

La técnica de reactividad al sabor, como se ha mencionado antes, requiere de la infusión directa y forzada de los fluidos en la cavidad bucal de los animales para registrar sus reacciones orofaciales. Con este fin, se llevó a cabo la implantación de una cánula de polietileno (Intramedic Clay Adams, PE90) en la cavidad bucal de cada rata, intervención que fue realizada en diferentes fases de los experimentos en función de su duración y objetivos. Para proceder a la implantación de las cánulas se administró a las ratas un fármaco anestésico por vía intraperitoneal, clorhidrato de ketamina (50 mg/kg; Imalgene 50mg/ml) combinado con un relajante muscular, clorhidrato de medetomidina (0,15 mg/kg; Domtor 1mg/ml). Al finalizar la intervención y durante todo el postoperatorio, se administró a los animales por vía subcutánea un antibiótico (enrofloxacino; 0,3 mg/kg; Alsir 2,5%) y un fármaco para combatir cualquier efecto inflamatorio (ketoprofeno; 1,5 mg/kg; Ketofen 1%).

Para la implantación de la cánula se rasuró la nuca a las ratas a unos 3 cm de la escápula y se limpió la zona con un producto antiséptico. Para perforar la piel y conducir de manera subcutánea la cánula hasta el interior de la cavidad bucal (aproximadamente a la altura del primer molar), se usó una aguja-guía de 10 cm de longitud a través de la cual se introducía la cánula de plástico que serviría para infundir el fluido. La cánula tenía una longitud de unos 12 cm, un diámetro interior de 0,86 mm y un diámetro exterior de 1,27 mm. Una vez introducida la cánula se retiraba la aguja-guía, quedando comunicada la boca del animal con el exterior a través de la cánula, como muestra la Figura 2. Para evitar que la cánula pudiera desajustarse, se colocaba en su extremo y antes de la operación, un tope de plástico que quedaba fijado al

Material y método general

interior de la cavidad bucal. Así mismo, el extremo de la cánula que quedaba al exterior, por detrás de la cabeza, se ajustaba a la piel mediante un tope de goma.

Tras la operación, las ratas fueron controladas durante un periodo de 3 días de recuperación de la intervención. Durante este periodo, se limpiaban diariamente las cánulas con agua destilada y se inyectaba a las ratas, si era preciso, nuevamente el fármaco antibiótico y el antiinflamatorio.

Figura 2. Implante de la cánula



Nota. Implante de la cánula con aguja-guía (arriba) y situación final en la cavidad bucal de la rata (abajo)

5.3. Pruebas conductuales

5.3.1. Test de reactividad al sabor

Las pruebas de reactividad al sabor se realizaron en una cabina del laboratorio privada de luz natural y provista de un aparato o dispositivo experimental, diseñado por nuestro laboratorio, con el fin de infundir los sabores y registrar las reacciones orofaciales de los animales. El aparato, reproducido en la Figura 3, constaba de un marco de madera pintada de negro (con unas medidas de 150 x 64 x 50 cm) en cuyos laterales se encontraban instalados dos puntos de luz de 50W de potencia con el objetivo de proporcionar una tenue iluminación. La parte superior del aparato estaba cubierta por una lámina de plexiglás (plástico transparente) y en su parte inferior tenía instalado un espejo (60 x 45 cm) con una inclinación de 45 grados, que permitía la grabación de los animales durante las sesiones experimentales.

Las ratas se situaban en la parte superior del aparato, alojadas en un compartimento de plexiglás transparente con forma de cuadrilátero (22,5 x 26 x 20 cm). La tapa de este compartimento, también de plexiglás y de color oscuro, poseía un agujero en el centro a través del cual se introducía un tubo de polietileno de unos 40 cm de longitud (1,19 mm de diámetro interior y 1,70 mm de diámetro exterior) conectado por uno de sus extremos a una jeringuilla de plástico (BD 5 ml) que contenía la solución gustativa y que se encontraba acoplada a una bomba de infusión (KD Scientific, modelo KDS-100-CE) para administrar el fluido en la boca de los animales (Figura 3). El otro extremo del tubo se conectaba directamente a la cánula del animal antes de comenzar el proceso de infusión del fluido. Las sesiones se grababan con una videocámara (Sony Handycam) orientada hacia la parte inferior del aparato, donde se

situaba un espejo. La videocámara, que se encontraba conectada a un ordenador, permitía almacenar directamente en el mismo las grabaciones de las reacciones orofaciales de las ratas.

Figura 3. Aparatos empleados durante el test de reactividad al sabor



Nota. Aparato experimental (arriba) y bomba de infusión (abajo) para la administración de los fluidos por vía intraoral.

Las reacciones orofaciales realizadas por los animales durante la infusión de los fluidos fueron registradas y posteriormente cuantificadas con el programa informático The Observer XT 9.0 (Noldus Information Technology b.v.), diseñado para el registro y análisis de la actividad conductual de los animales. En la tabla siguiente (Tabla 1), se presentan las respuestas más características evaluadas en el test de reactividad al sabor y en qué términos se definen (Bures et al., 1998):

Tabla 1. Respuestas características evaluadas en el test de reactividad al sabor (adaptado de Bures et al., 1998).

Respuestas de ingesta o apetitivas

Movimientos rítmicos de la boca (*mouth movements*):

Descenso de la mandíbula inferior de forma rítmica y acompasada, relacionado con el acto de ingerir el fluido.

Protrusiones o desplazamientos hacia delante de la lengua (*tongue protrusions*):

Extensiones centrales de la lengua sobre el labio superior.

Protrusiones laterales de la lengua (*lateral tongue protrusions*):

Extensiones laterales de la lengua combinadas con la retracción unilateral del labio superior.

Lameteo de las patas anteriores (*paw licking*):

Extensiones centrales de la lengua directamente sobre las patas delanteras, aproximándolas a la cavidad bucal.

Respuestas de rechazo o aversivas

Arcadas (*gaping*):

Bajada de la mandíbula con exposición de los incisivos inferiores, retracción de la comisura de la boca y expulsión del fluido.

Frotamiento de la barbilla (*chin rubbing*):

Rozamiento de la barbilla contra la superficie del suelo o las paredes con expulsión del fluido

Movimiento de las patas delanteras (*paw treading*):

Movimientos sincroizados de las patas delanteras.

Movimiento de cabeza (*head shakes*):

Sacudidas de la cabeza de lado a lado y con la boca abierta, expulsando el fluido .

Limpieza con las patas (*paw wipes*):

Uso de las patas anteriores para eliminar el fluido de la cavidad bucal.

Movimientos bruscos de las extremidades anteriores (*forelimb flails*):

Agitación de las patas delanteras con la intención de eliminar el fluido del pelaje.

Goteo pasivo (*passive drip*):

Ausencia de respuestas de ingesta con goteo hacia el suelo del fluido acumulado en la boca.

5.3.2. Pruebas de consumo

Las pruebas de consumo que se llevaron a cabo en todos los experimentos de esta tesis consistieron en pruebas convencionales de elección entre dos botellas que se presentaban de forma simultánea y con diferente contenido, en función de la serie experimental. En este sentido, las botellas podían contener una solución gustativa frente a agua o frente a un sabor alternativo. En todas las pruebas, ya fuesen antes o después del entrenamiento, los sujetos eran expuestos a las botellas con los fluidos durante 5 min. La posición inicial de las botellas con las soluciones fue contrabalanceda de manera que, para la mitad de los sujetos de cada grupo, la botella que contenía un sabor se colocaba en el lado izquierdo de la rejilla de la jaula de alojamiento y la botella que contenía el agua (o el sabor alternativo) se colocaba en el lado derecho. Para el resto de los animales se invertía la posición de las botellas. Además, con el fin de asegurarse de que los sujetos pudieran beber de ambas soluciones y evitar cualquier predisposición para beber en una localización concreta, se intercambié la posición de las botellas a la mitad del tiempo total de exposición, es decir una vez transcurridos 180 s. De esta forma, se corregía la posibilidad de que lo animales escogieran una de las botellas al azar, evitando el sabor alternativo al no haberlo probado. Si el procedimiento requería de pruebas de consumo sucesivas, en la siguiente prueba se contrabalanceda el orden de presentación de las soluciones, siguiendo el mismo protocolo descrito pero invirtiendo el lugar inicial de presentación de cada solución.

El consumo de cada uno de los sabores se calculaba restando al peso inicial registrado antes de la exposición a la botella con el fluido el peso final de la misma una vez transcurridos los 5 min de duración de la prueba.

5.4. Procedimiento experimental

Aunque el método empleado varía de un experimento a otro en función de los objetivos perseguidos, en general se puede dividir en las siguientes fases:

5.4.1. Fase de privación

Dada la medida utilizada en este trabajo para evaluar la preferencia condicionada (consumo) y el hecho de que los sabores se presentaban diluidos en agua destilada, consideramos conveniente inducir a los animales un estado motivacional estrechamente relacionado con la respuesta de ingesta del fluido; así pues, en todos los experimentos se implantó un programa de privación de agua en el cual se restringió su acceso a 60 minutos diarios, transcurrida una hora tras el final de cada sesión experimental (a excepción de los días en los que los animales fueron operados para la implantación de las cánulas, que tuvieron agua *ad libitum* para evitar que sufriesen una fuerte deshidratación tras la intervención quirúrgica). Seguidamente y con el fin de habituar a los animales al procedimiento, se realizaron 4 sesiones para familiarizar a los animales a ingerir líquido de los tubos calibrados que se emplearían más tarde durante el condicionamiento y las pruebas. Los animales tenían acceso a un tubo con agua que se intercambiaba de lado en la jaula en mitad de la sesión, contrabalanceando su posición inicial a lo largo de las sesiones. En las dos primeras sesiones los tubos se exponían durante 5 min en cada lado, mientras que en las dos últimas sesiones el tiempo se redujo a 2.5 min en cada lado, la misma duración que se emplearía más tarde en el condicionamiento y en la prueba con los sabores. De este modo, además de habituar los animales a beber en ambos lados, se evitaba cualquier efecto de preferencia por una localización concreta de los tubos en la jaula de

alojamiento. En estas sesiones se registró la cantidad de agua consumida con el fin de establecer una línea base de consumo de líquido. Este programa de privación de agua se mantuvo a lo largo de la realización de cada experimento, manteniendo a los animales motivados para beber durante todas las fases en las que la respuesta de ingesta se hacía necesaria.

5.4.2. Fase de entrenamiento

Esta fase tenía por objeto establecer la preferencia condicionada por un sabor (EC) por su asociación con otra solución gustativa (EI) con propiedades reforzantes (nutritivas) o sin ellas, según el objetivo de cada experimento realizado. Para este fin, el procedimiento general en todas las series experimentales siguió un esquema similar basado en 4 ciclos de entrenamiento de 2 días cada uno. Durante estas sesiones los sujetos recibían los sabores bajo dos condiciones de presentación diferentes, o bien de forma conjunta combinados en la misma disolución (condición emparejada) o por separado en disoluciones diferentes (condición no-emparejada). Los sujetos de la condición emparejada tenían acceso el primer día de cada ciclo a un tubo con el sabor que se pretendía condicionar (solución ácida de limón) mezclado en la misma disolución con la sustancia que actuaba como EI en cada experimento (sacarina, sacarosa o maltodextrina). Con el objetivo de igualar el consumo entre los grupos durante los ensayos, el segundo día de cada ciclo se proporcionaba a los sujetos de esta condición experimental agua en el tubo calibrado. Los sujetos de la condición no-emparejada, por su parte, recibían durante el entrenamiento la exposición a los fluidos (EC y EI) por separado y en días alternos, es decir, uno de los sabores cada día del entrenamiento.

En ambas condiciones experimentales, la localización del tubo de bebida con el fluido se contrabalanceó a lo largo de los ciclos y en cada sesión. En el primer día del primer ciclo, la mitad de los sujetos de cada condición recibía la solución gustativa correspondiente en el lado derecho de la jaula y la otra mitad de los sujetos recibía la misma solución en el lado izquierdo; en el segundo día del ciclo, se repetía la misma operación pero con la solución gustativa alternativa. Así pues, en el primer día del ciclo siguiente la posición inicial del tubo con la solución gustativa se invertía respecto al ciclo anterior. De este modo y dado que el entrenamiento constaba de 4 ciclos, todos los sujetos tenían acceso a ambas soluciones, en ambos lados de la jaula y con el mismo número de exposiciones. Además, como las sesiones de entrenamiento tenían una duración total de 5 min, una vez transcurrida la mitad del tiempo de exposición (a los 2.5 min) se intercambiaba la disposición de los tubos de bebida en las jaulas experimentales. Con este sencillo método, los animales se veían obligados a beber de ambos lados de la jaula en cada sesión.

El consumo de cada fluido, al igual que en las pruebas posteriores, se calculaba restando al peso inicial de las botellas (antes de la presentación) el peso final de las mismas una vez transcurridos los 5 min de exposición.

Como se sabe, la exposición repetida a un sabor novedoso produce un aumento en su consumo y en su preferencia frente a agua o un sabor alternativo. Por lo tanto, la utilización de la condición de control no-emparejada nos permite determinar el efecto de la experiencia simple con el sabor (reducción de la neofobia, por ejemplo) y si la preferencia desarrollada por la condición emparejada responde a su asociación con las propiedades de la solución que le acompaña.

5.4.3. Fase de devaluación

En algunos de los experimentos realizados se empleó un procedimiento conocido como “devaluación asociativa del reforzador” (Colwill y Rescorla, 1985) para modificar el valor hedónico de la solución gustativa que actúa como EI durante el desarrollo de la preferencia condicionada. La técnica consiste en asociar el consumo del sabor con los efectos eméticos de una inyección de LiCl, dando lugar al rechazo posterior del mismo y a la producción de reacciones oro-faciales aversivas cuando se infunde la solución por vía intraoral durante una prueba de reactividad al sabor. La aplicación de la técnica a nuestro estudio se hizo siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

La fase de devaluación en los experimentos que requerían de este procedimiento constó de 4 sesiones experimentales agrupadas en dos ciclos de 2 sesiones cada uno. El primer día de cada ciclo, los animales de la condición de devaluación tuvieron acceso durante 5 minutos a un tubo de bebida que contenía la solución reforzante. Inmediatamente después se les administraba una inyección de litio cloruro (LiCl), por vía intraperitoneal, en una concentración de 0.15M y a una proporción de 20 ml/kg de peso corporal. Los sujetos de control para la devaluación, consumieron también la solución reforzante durante 5 minutos pero eran inyectados con una solución vehículo de suero salino en una concentración isotónica (0,9%) y a la misma proporción de volumen por peso que los animales de la condición devaluada (20 ml/kg). El segundo día de cada ciclo de devaluación, tanto los sujetos inyectados con LiCl como los sujetos de control tuvieron acceso sin límite a agua en sus jaulas de alojamiento para la recuperación de los efectos adversos de las soluciones inyectadas.

Durante las sesiones de devaluación se contrabalanceó también la disposición de los tubos con la sustancia devaluada en las jaulas de alojamiento, proporcionando el

fluido a la mitad de los sujetos de cada grupo en la parte derecha de las jaulas y al resto en la parte izquierda. Como la exposición total del fluido era de 5 minutos, transcurrida la mitad del tiempo se cambiaba la disposición de los tubos en las jaulas al lado contrario para evitar cualquier efecto de preferencia por la disposición de los tubos con la bebida. Así mismo, la posición inicial de los tubos también fue contrabalanceada a lo largo de los ciclos, de forma que en el primer día del segundo ciclo, los tubos se colocaban de inicio en el lado contrario respecto al primer día del primer ciclo, cambiando nuevamente su disposición una vez transcurridos los primeros 2.5 min.

5.5. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los datos obtenidos en los experimentos se realizaron con el programa informático IBM SPSS Statistics 21. Una vez registrados los consumos durante las pruebas de elección con dos botellas (pruebas de consumo y de extinción), en cada experimento se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas para determinar si los cambios producidos durante el condicionamiento en cuanto a la preferencia por los sabores eran estadísticamente significativos. Un análisis de las comparaciones múltiples con el ajuste de Bonferroni indicó entre qué grupos y en qué fases se producían estas diferencias. En cuanto a la frecuencia de las respuestas de aceptación y de rechazo de las soluciones gustativas (prueba de reactividad al sabor), se compararon los valores de los grupos mediante una prueba T de comparación de medias para muestras independientes, determinando así la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas cuando la comparación se realizaba entre 2 grupos. Cuando la comparación implicaba más de 2 grupos, se efectuó un

análisis de la varianza (ANOVA) para indicar la existencia o no de diferencias significativas. Posteriormente y con la intención de determinar entre qué grupos se daban estas diferencias, se realizaron pruebas *post hoc* con el estadístico de Student-Newman-Keuls, siempre y cuando se cumpliera el supuesto de homogeneidad de las varianzas. Cuando no fue posible asumir varianzas iguales, se utilizó el estadístico Games-Howell para observar entre qué grupos se producían diferencias significativas. En todo momento se adoptó como índice de significación un valor de $p < 0.05$.

Capítulo 6

**Evaluación del efecto de preferencia condicionada
por el sabor y sus bases asociativas**

Esta primera serie experimental constó de tres estudios que se realizaron con el objetivo principal de examinar el efecto de preferencia condicionada por el sabor con la metodología de la reactividad oro-facial o prueba de reactividad al sabor. En segundo lugar se pretendía probar si el desarrollo de la preferencia gustativa obedecía al establecimiento de una asociación sabor-sabor o una asociación sabor-nutriente (véase la Introducción). Para ello se proporcionó a los sujetos experimentales un sabor (ácido cítrico) combinado con una sustancia no calórica como el edulcorante sintético sacarina (Experimento 1) o con sustancias con propiedades calóricas o nutritivas como sacarosa (Experimento 2) y maltodextrina, un polímero de glucosa (Experimento 3). Mediante la estimación de los consumos de los sabores en las pruebas de elección con dos botellas y el análisis de las reacciones orofaciales de los sujetos en la prueba de reactividad al sabor se pretende obtener información acerca de los diferentes tipos de asociaciones implicadas en esta variedad de aprendizaje asociativo

Como se ha mencionado, en esta serie de tres experimentos, para producir la preferencia condicionada por el sabor se utilizó como estímulo condicionado (EC) una solución moderadamente desagradable de ácido cítrico (limón) en combinación con las sustancias gustativas mencionadas (sacarina, sacarosa o maltodextrina) que actuaban como estímulo incondicionado EI. El Experimento 1 nos permitía obtener información acerca del mecanismo de aprendizaje sabor-sabor, dado que se utiliza sacarina como EI, una sustancia con sabor dulce y por naturaleza agradable para las ratas pero sin poder calórico alguno. En el Experimento 2 se empleó sacarosa como EI, una sustancia que posee tanto el componente de alta palatabilidad, por su sabor dulce, como el aspecto nutritivo, lo que nos permite obtener información sobre la acción de ambos mecanismos de aprendizaje, asociaciones sabor-sabor y sabor-nutriente. Por último, la

utilización en el Experimento 3 de una solución de maltodextrina, un polisacárido con un poder nutritivo similar a la sacarosa pero sin sabor dulce, nos informa acerca del mecanismo de aprendizaje sabor-nutriente. El análisis de las respuestas hedónicas en la prueba de reactividad al sabor nos permite también obtener información acerca de la acción de las propiedades hedónicas del EI en el aprendizaje de preferencia por el sabor y en qué medida este aprendizaje se relaciona con el componente sensorial (mecanismo sabor-sabor) o el componente nutritivo (mecanismo sabor-nutriente) de las soluciones utilizadas para producir la preferencia condicionada.

6.1. Experimento 1

Preferencia condicionada con sacarina como EI

El objetivo de este primer experimento fue determinar, con nuestra metodología de reactividad al sabor, si se produce un cambio en la preferencia por una sustancia gustativa moderadamente aversiva (ácido cítrico) debido a su asociación con sacarina, una sustancia sin poder calórico pero con sabor dulce. Para ello, durante la fase de condicionamiento, la mitad de las ratas participantes en el experimento recibió la solución de ácido cítrico (EC) combinada en la misma disolución con sacarina (EI) mientras que los restantes animales recibieron en días sucesivos presentaciones de la solución ácida de limón y de sacarina por separado. En la prueba ambos grupos recibieron una elección entre el ácido cítrico (EC) y agua. Si se produce el condicionamiento de la preferencia gustativa, debería observarse un aumento en el consumo de limón (EC) en el grupo que lo consumió previamente combinado con sacarina. Una prueba final de reactividad al sabor, administrando el limón por vía intraoral a los animales, nos permitiría conocer si dicha preferencia condicionada responde a un aumento en la palatabilidad o valoración hedónica del fluido.

6.1.1. Sujetos y soluciones

Los sujetos empleados en este estudio fueron 24 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*) procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Las ratas tenían unos tres meses de aproximadamente y un peso medio al comienzo del experimento de 324 gramos (rango 253-395 g). A su llegada al laboratorio, todos los animales fueron alojados y controlados en las condiciones que se han descrito en el capítulo 5 sobre materiales y método general.

Como estímulo gustativo (EC) se utilizó una solución moderadamente aversiva de limón obtenida al diluir ácido cítrico en agua destilada a una concentración del 3%. Para inducir la preferencia se empleó como EI una solución de sacarina diluida también en agua destilada al 0,1%.

6.1.2. Procedimiento

El experimento contó de varias fases como se muestra en la Tabla 2. Dado que los aspectos de procedimiento comunes a todos los experimentos se describieron en la sección del método general (capítulo 5), aquí sólo se comentarán detalles específicos de las manipulaciones experimentales realizadas.

Se sometió en primer lugar a las ratas a un programa de privación de agua de 4 días de duración. Durante estas sesiones, las ratas recibieron una exposición de duración limitada a agua en tubos calibrados situados en las jaulas de alojamiento para familiarizarlos con la situación experimental y habituarlos a beber a ambos lados de las jaulas. En las primeras 2 sesiones la duración de la exposición a los tubos con agua fue de 10 minutos, reduciéndose a 5 minutos en las dos últimas sesiones. Durante el curso

del experimento tuvieron acceso permanente a la comida de mantenimiento. Posteriormente, los animales fueron asignados a dos grupos en base al consumo de agua registrado en la fase de privación, con el fin de evitar diferencias significativas entre los grupos en cuanto a los niveles de consumo de fluido. Así pues, los diferentes grupos se conformaron según el tratamiento experimental que recibirían más tarde: sujetos que reciben una exposición diaria a los dos sabores combinados en la misma disolución o presentación conjunta (Grupo CON) y sujetos que reciben los dos sabores por separado en días alternos o presentación separada (Grupo SEP).

Antes de comenzar la fase de condicionamiento, todos los sujetos recibieron una prueba previa o pre-test para evaluar la preferencia incondicionada por el limón. Esta prueba de elección consistió en la exposición simultánea, durante 5 minutos, a dos tubos calibrados que contenían respectivamente la solución de ácido cítrico y agua. En la sección de método general se describe la forma de llevar a cabo esta prueba, la disposición de las botellas con los fluidos en las jaulas y su contrabalanceo. Al finalizar la prueba se registraron los consumos de ambos grupos para determinar la preferencia por el limón. La fase de condicionamiento comenzó al día siguiente.

Las sesiones de condicionamiento consistieron en 4 ciclos de entrenamiento con dos sesiones cada uno. El primer día de cada ciclo, los sujetos de la condición conjunta (Grupo CON) recibían una exposición a los dos sabores (limón y sacarina) mezclados en la misma disolución mientras que el segundo día de cada ciclo recibían una exposición a agua en los tubos de bebida. Por su parte, los sujetos de la condición separada (Grupo SEP) recibían el primer día de cada ciclo la solución de ácido cítrico, mientras que el segundo día recibían la solución de sacarina.

Una vez realizadas las 8 sesiones de esta fase, se efectuó una prueba de preferencia entre limón y agua, similar al pre-test realizado antes del condicionamiento, con el fin de determinar si el entrenamiento dio lugar a un cambio en la preferencia condicionada por el ácido cítrico.

Tras esta prueba se procedió a intervenir quirúrgicamente a los animales para implantarles la cánula intraoral de cara a la prueba de reactividad al sabor. En el apartado de metodología general (Capítulo 5) se describe con detalle cómo se lleva a cabo el procedimiento quirúrgico. Debe señalarse que tras la operación quirúrgica dos sujetos asignados al Grupo CON fueron eliminados del estudio al haber perdido las cánulas durante el período de recuperación. El número de sujetos en cada grupo quedó del siguiente modo: Grupo CON (n= 12) y Grupo SEP (n= 10).

Después de la implantación de las cánulas a los animales y tras su recuperación de la intervención, se llevó a cabo una sesión de habituación para familiarizar a los animales con el procedimiento de infusión intraoral. Durante esta sesión se infundió a los animales 1 ml de agua destilada durante 1 minuto (tasa de infusión 1 ml/min). La prueba de reactividad al sabor se realizó al día siguiente y consistió en administrar a todos los sujetos una infusión de 3 ml de la solución de limón durante 3 minutos (tasa de infusión 1 ml/min), al tiempo que se grababan las reacciones oro-faciales para su reproducción y cuantificación posteriores.

Finalmente se realizó una fase de extinción para examinar los cambios en la preferencia de los animales por el limón tras una experiencia repetida con esta sustancia sin combinarla con sacarina. Esta prueba constó de 3 ensayos que se realizaron en días sucesivos y consistieron en la exposición simultánea al sabor de limón frente a agua en una prueba de elección similar a la realizada el día de la prueba.

Tabla 2. Diseño del Experimento 1

Grupo	Pre-test	Entrenamiento x 4		Test	Canulación	TRT	Extinción x 3
SEP	Agua	Limón	Sacarina	Agua	Implantación de cánula en la cavidad oral	3 ml Limón IO	Agua Vs Limón
CON	Limón	Limón + Sacarina	Agua	Limón			

Nota. SEP: presentación por separado; CON: presentación conjunta; TRT: test de reactividad al sabor; IO: administración intraoral.

6.1.3. Resultados

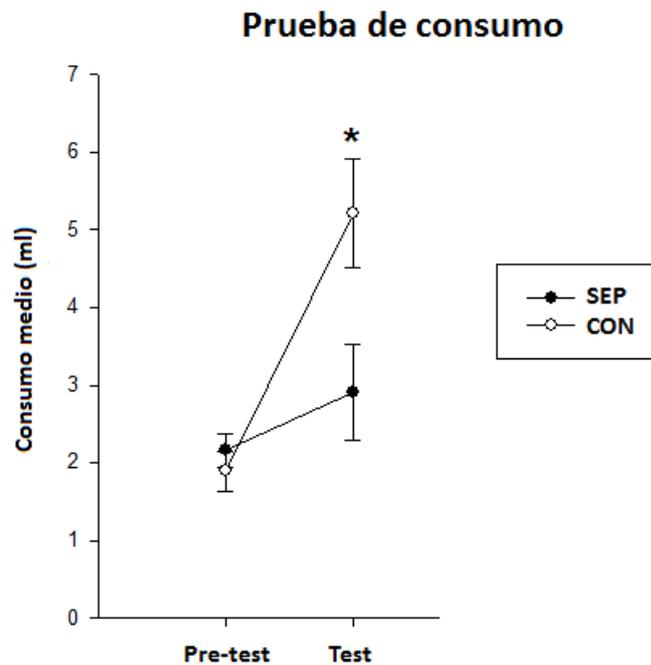
6.1.3.1. Prueba de consumo

Como se muestra en la Figura 4a, en la prueba inicial de preferencia incondicionada por el limón (pre-test), los sujetos de ambos grupos, CON y SEP, mostraron un consumo similar de esta solución. Durante la prueba de elección entre limón y agua realizada tras el condicionamiento, los sujetos del Grupo CON consumieron en mayor medida la solución de limón que los sujetos del Grupo SEP, indicando que la experiencia conjunta con los sabores (limón + sacarina) había producido un incremento en la preferencia condicionada por el limón. Un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con medidas repetidas, siendo el Grupo (CON y SEP) el factor inter-sujetos y las Sesiones (pre-test y test) el factor intra-sujetos, mostró un efecto significativo del factor Sesiones [$F_{(1,20)} = 16,741$; $p = 0,001$] así como de la interacción Grupo x Sesiones [$F_{(1,20)} = 6,685$; $p = 0,018$]. Posteriormente, el análisis de las comparaciones múltiples en base al ajuste de Bonferroni reveló diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de sujetos en la sesión de prueba

realizada tras el condicionamiento [$F_{(1,20)} = 5,826$; $p = 0,025$], pero no en la sesión pre-test [$F_{(1,20)} = 0,626$; $p = 0,438$]. Estos resultados indican que la experiencia conjunta del limón con sacarina durante la fase de condicionamiento favoreció el desarrollo de una preferencia condicionada por la solución cítrica.

Los consumos correspondientes al pre-test y a la prueba final se presentan en la Tabla 3a. Así mismo, los consumos registrados durante la fase de condicionamiento se muestran también en la Tabla 3b.

Figura 4a. Experimento 1: Prueba de consumo



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para ambos grupos, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), en cada la pruebas de consumo inicial (Pre-test) y en la prueba de consumo realizada tras el condicionamiento (Test). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 3a. Experimento 1: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo

Grupo	Pre-test	Test
SEP	2,16 ($\pm 0,21$)	2,91 ($\pm 0,61$)
CON	1,89 ($\pm 0,25$)	5,21 ($\pm 0,70$)

Nota. Consumo medio de la solución de limón (ml) para cada grupo, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), durante la prueba de preferencia inicial (Pre-test) y la prueba tras el condicionamiento (Test). Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 3b. Experimento 1: Consumos registrados durante la fase de condicionamiento

Grupo	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
SEP	4,23 ($\pm 0,52$)	7,49 ($\pm 0,72$)	4,62 ($\pm 0,28$)	8,56 ($\pm 0,52$)	5,22 ($\pm 0,38$)	8,13 ($\pm 0,44$)	6,11 ($\pm 0,40$)	8,67 ($\pm 0,36$)
CON	3,55 ($\pm 0,29$)	7,35 ($\pm 0,55$)	4,82 ($\pm 0,39$)	8,00 ($\pm 0,42$)	6,51 ($\pm 0,24$)	6,63 ($\pm 0,45$)	7,70 ($\pm 0,38$)	7,41 ($\pm 0,40$)

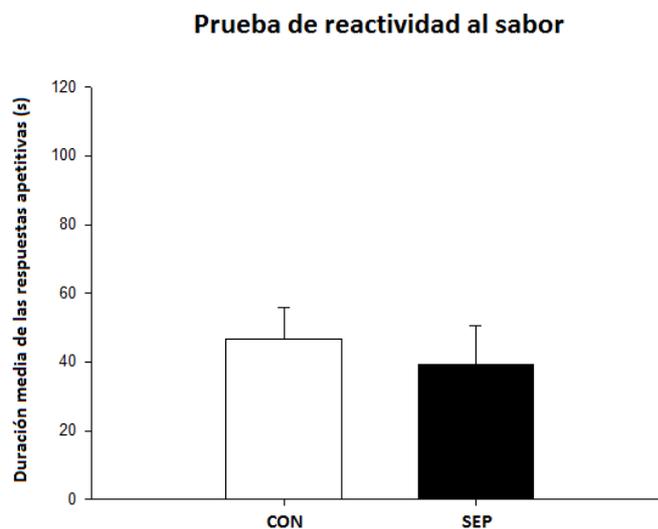
Nota. Consumo medio (ml) de la solución gustativa correspondiente a cada grupo durante la fase de condicionamiento. El grupo CON (presentación conjunta) recibió limón + sacarina en los ensayos Tipo A y agua en los ensayos Tipo B. El grupo SEP (presentación separada) recibió limón en los ensayos Tipo A y sacarina en los ensayos Tipo B. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

6.1.3.2. Prueba de reactividad al sabor

Respuestas apetitivas

La prueba de reactividad al sabor mostró que los animales de ambos grupos presentaban una tasa similar de respuestas apetitivas o de aceptación durante la infusión intraoral de la solución de limón. La Figura 4b muestra el número medio de respuestas apetitivas para cada grupo en esta prueba (obtenido al contabilizar el tiempo total que los sujetos permanecen mostrando protrusiones de la lengua, movimientos de la boca y lameteo de las patas). El análisis de estos datos con una prueba T-test de comparación de medias para muestras independientes mostró que el número de reacciones apetitivas no presentaba diferencias estadísticamente significativas entre los grupos [$t_{(20)} = 0,490$; $p=0,629$].

Figura 4b. Experimento 1: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad

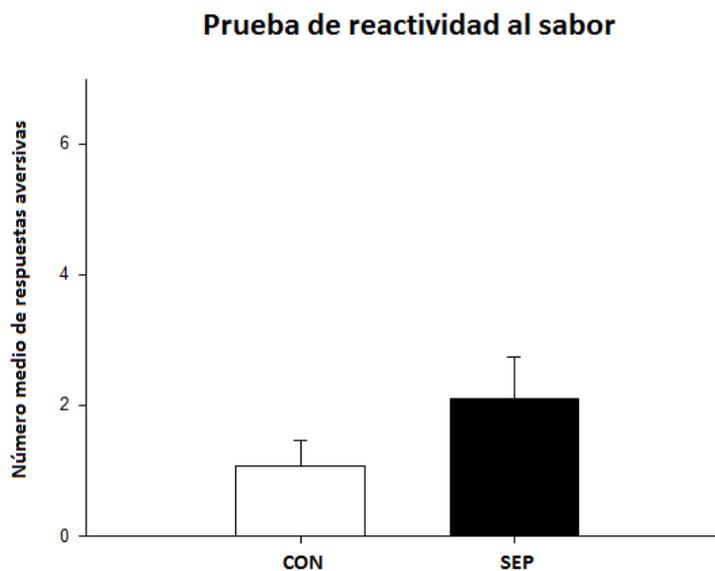


Nota. Duración media (en segundos) de las respuestas apetitivas durante la infusión de la solución de limón para cada grupo, grupo CON (presentación conjunta) y grupo SEP (presentación separada), en la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Respuestas aversivas

Por otra parte, como se puede observar en la Figura 4c, tampoco hubo diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto al número de respuestas aversivas o de rechazo del sabor (número total de arcadas, frotamientos de la barbilla y movimientos de las patas delanteras) mostradas por los animales durante la prueba de reactividad oro-facial [$t_{(20)} = 1,397$; $p = 0,178$].

Figura 4c. Experimento 1: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad



Nota. Número medio de respuestas aversivas o de rechazo al ácido cítrico mostradas por los sujetos de ambos grupos, SEP (presentación separada) y CON (presentación conjunta), durante la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Examinando estos resultados, parece que la valoración hedónica de una solución que se ha condicionado con sacarina no está relacionada con la transferencia de las propiedades sensoriales (su sabor dulce) de la sustancia gustativa utilizada para desarrollar dicha preferencia. Esto indicaría que la asociación sabor-cualidades hedónicas podría no estar relacionada con mecanismo de aprendizaje sabor-sabor cuando se desarrolla una preferencia condicionada con sacarina como EI.

La Tabla 3c presenta los valores promedio para los diferentes tipos de respuestas analizadas en esta prueba.

Tabla 3c. Experimento 1: Respuestas registradas en la prueba de reactividad

Grupo	Respuestas Apetitivas	Respuestas Aversivas
SEP	39,10 ($\pm 11,50$)	2,10 ($\pm 0,60$)
CON	46,55 ($\pm 9,23$)	1,08 ($\pm 0,39$)

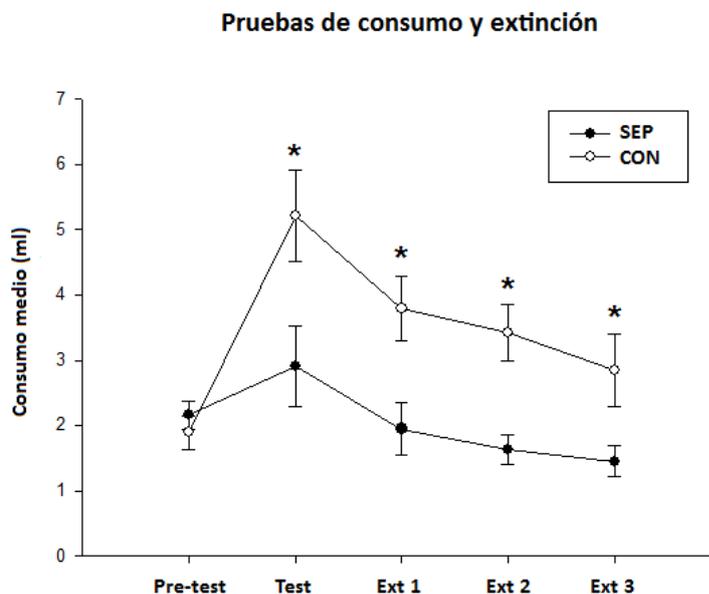
Nota. Duración media de las respuestas apetitivas y aversivas mostradas por los animales de cada grupo, SEP (presentación separada) y CON (presentación conjunta), ante la infusión de limón en la prueba de reactividad al sabor. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

6.1.3.1. Prueba de extinción

Finalmente, durante los ensayos de extinción se observó una reducción progresiva de la preferencia condicionada previamente al limón; esto es, se redujo paulatinamente el consumo de esta solución en el Grupo CON en comparación con el Grupo SEP tal y como se muestra en la Figura 4d. Un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con la variable grupo como factor inter-sujetos y las sesiones de extinción como variable intra-sujetos (4 sesiones incluyendo el consumo del día de la prueba al considerarse un ensayo de extinción mas) volvió a mostrar un efecto estadísticamente significativo del factor sesión [$F_{(3,60)}=4,931$; $p=0,004$] y del factor grupo [$F_{(1,20)}=36,622$; $p=0,000$]. La interacción grupo*sesiones no resultó significativa [$F_{(3,60)}=0,752$; $p=0,862$]. En este caso, el análisis de las comparaciones múltiples con el ajuste de Bonferroni indicó que, efectivamente, hubo diferencias significativas entre los consumos de los dos grupos en las cuatro sesiones de extinción [$F_{\alpha(1,20)}>4,615$; $p<0,05$]. Este dato pone de manifiesto la elevada resistencia a la extinción de la preferencia gustativa por el limón producida tras el condicionamiento.

Los consumos medios de la solución de ácido cítrico de cada grupo en los diferentes ensayos de extinción se muestran en la Tabla 3d.

Figura 4d. Experimento 1: Prueba de extinción



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), durante la prueba inicial (Pre-test), la prueba de preferencia (Test) y la prueba de extinción (Ext 1, 2 y 3). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 3d. Experimento 1: Consumos registrados durante la prueba de extinción

Grupo	Extinción 1	Extinción 2	Extinción 3
SEP	1,95 (\pm 0,40)	1,63 (\pm 0,22)	1,45 (\pm 0,24)
CON	3,80 (\pm 0,49)	3,42 (\pm 0,43)	2,85 (\pm 0,55)

Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), durante la prueba de extinción. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

6.2. Experimento 2

Preferencia condicionada con sacarosa como EI

Continuando con esta serie experimental y dado que en el primer experimento se evaluó el cambio en la preferencia por el ácido cítrico utilizando una solución de sacarina como EI, en este segundo experimento se utilizó una solución de sacarosa para establecer la preferencia condicionada. Esta solución, aparte de poseer un sabor dulce como la sacarina, posee también un componente nutritivo que podría influir en el desarrollo de la preferencia por el sabor y su valoración hedónica. En esta ocasión, la mitad de las ratas recibió durante el entrenamiento la solución de ácido cítrico (EC) combinada con la sacarosa (EI) en la misma disolución, mientras que la otra mitad recibió el ácido cítrico y la sacarosa por separado en distintas sesiones. Al igual que en el experimento anterior con sacarina como EI, la preferencia por el ácido cítrico debería verse aumentada en una prueba de preferencia posterior en el grupo (Grupo CON) que recibe este sabor mezclado con sacarosa en comparación con el grupo (Grupo SEP) que lo recibe independientemente de la sacarosa.

6.2.1. Sujetos y soluciones

Los sujetos empleados en este experimento fueron 24 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*) procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Las ratas tenían tres meses de edad aproximadamente y un peso medio al comienzo del experimento de 325 gramos (rango 277-394 g). Como en el primer experimento, a su llegada al laboratorio todos los animales se alojaron y mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado de materiales y método general del Capítulo 5.

El estímulo gustativo (EC) utilizado en este experimento fue nuevamente una solución de ácido cítrico diluido en agua destilada a una concentración del 3%. Como sabor inductor de la preferencia (EI), se utilizó una solución de sacarosa diluida también en agua destilada al 8%.

6.2.2. Procedimiento

El procedimiento seguido en el Experimento 2 fue análogo al que se ha descrito para el Experimento 1, como se indica en la Tabla 4.

Concluida la fase de privación de agua y en base a su consumo, los animales fueron asignados a dos grupos (CON y SEP) que diferían en el tratamiento experimental que recibirían durante la fase de condicionamiento; esto es, si la solución de ácido cítrico se presenta mezclada o conjuntamente con la solución de sacarosa (Grupo CON) o si ambas soluciones se presentan independientemente o por separado (Grupo SEP). Antes de comenzar la fase de condicionamiento se realizó un pre-test de 5 minutos en el cual las ratas debían escoger entre una botella con ácido cítrico y una

botella con agua destilada. Esta prueba inicial tenía como objetivo examinar la preferencia incondicionada de los animales por el sabor a limón.

La fase de condicionamiento transcurrió exactamente igual que en el experimento anterior pero utilizando la solución de sacarosa en lugar de la solución de sacarina como EI. El primer día de cada ciclo de condicionamiento, el Grupo SEP recibió una exposición a la solución de limón mientras que el segundo día de cada ciclo recibió la solución de sacarosa. El Grupo CON recibió las dos soluciones formando un compuesto (limón + sacarosa) la primera sesión de cada ciclo y agua el segundo día.

Tras esta fase, se realizó una prueba para evaluar la magnitud de la preferencia adquirida por la solución de limón.

Seguidamente se procedió a la implantación de las cánulas a los animales para la infusión de los sabores durante la prueba de reactividad facial. En este experimento, un sujeto del Grupo EMP perdió la cánula durante la recuperación de la intervención de implante y fue retirado del estudio, quedando los grupos formados por el siguiente número de sujetos: Grupo CON (n=11) y Grupo SEP (n=12).

Una vez transcurrido el período de recuperación de la intervención se llevó a cabo la sesión de familiarización con el aparato experimental y el procedimiento de infusión intraoral y, al día siguiente, la prueba de reactividad al ácido cítrico, en los términos descritos para el Experimento 1.

Por último, se llevó a cabo la fase de extinción de la preferencia (3 sesiones), también de forma similar al experimento anterior.

Tabla 4. Diseño del Experimento 2

Grupo	Pre-test	Entrenamiento x 4		Test	Canulación	TRT	Extinción x 3
SEP	Agua	Limón	Sacarosa	Agua	Implantación de cánula en la cavidad oral	3 ml Limón IO	Agua Vs Limón
CON	Limón	Limón + Sacarosa	Agua	Limón			

Nota. SEP: presentación por separado; CON: presentación conjunta; TRT: test de reactividad al sabor; IO: administración intraoral.

6.2.3. Resultados

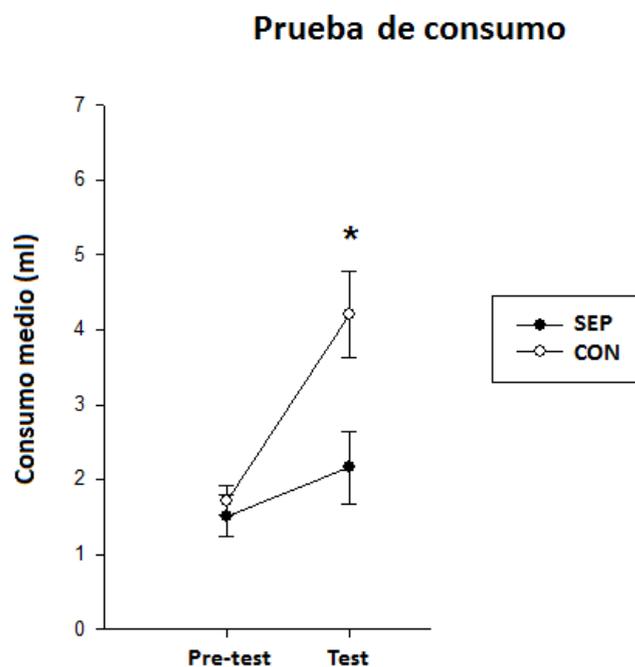
6.2.3.1. Prueba de consumo

Tal y como ocurrió en el primer experimento, donde se utilizó sacarina para condicionar la preferencia por el limón, usando sacarosa como El se produjo un patrón de consumo similar durante el pre-test inicial y durante la prueba final. Como se puede apreciar en la Figura 5a, los grupos CON y SEP consumieron una cantidad similar de limón durante el test preliminar de preferencia, pero tras la fase de condicionamiento el grupo CON presentó un consumo de ácido cítrico superior, indicando que la experiencia conjunta (limón + sacarosa) provocó un incremento en la preferencia por el limón. El análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con dos factores, Sesiones como variable intra-sujetos y Grupo como factor inter-sujetos, mostró un efecto significativo del factor Sesiones, que incluía los consumos correspondientes al pre-test y a la prueba [$F_{(1,21)} = 15,407$; $p = 0,001$] y del factor Grupo [$F_{(1,21)} = 6,938$; $p = 0,16$], así como una interacción significativa Sesiones x grupo [$F_{(1,21)} = 5,271$; $p = 0,032$]. El ajuste de Bonferroni para el análisis de las comparaciones múltiples destacó la

ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto al consumo de ácido cítrico durante el pre-test [$F < 1$], mientras que en la prueba final las diferencias en el consumo de limón entre los grupos si resultaron significativas [$F_{(1,21)} = 7,460$; $p = 0,013$]. Estos resultados corroboran que la exposición al limón y a la sacarosa de forma conjunta durante la fase de condicionamiento fomentó el desarrollo de la preferencia condicionada hacía la solución de ácido cítrico.

En la Tabla 5a se muestran los consumos de limón correspondientes a estas dos pruebas que acabamos de contrastar. Los consumos registrados durante la fase de condicionamiento se muestran también en la Tabla 5b.

Figura 5a. Experimento 2: Prueba de consumo



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para ambos grupos, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), en cada la pruebas de consumo inicial (pre-test) y en la prueba de consumo realizada tras el condicionamiento (Test). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 5a. Experimento 2: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo

Grupo	Pre-test	Test
SEP	1,51 ($\pm 0,27$)	2,16 ($\pm 0,48$)
CON	1,72 ($\pm 0,20$)	4,20 ($\pm 0,57$)

Nota. Consumo medio de la solución de limón (ml) para cada grupo, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), durante la prueba de preferencia inicial (Pre-test) y la prueba tras el condicionamiento (Test). Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 5b. Experimento 2: Consumos registrados durante la fase de condicionamiento

Grupo	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
SEP	2,45 ($\pm 0,17$)	4,12 ($\pm 0,39$)	4,12 ($\pm 0,36$)	7,10 ($\pm 0,41$)	5,08 ($\pm 0,26$)	8,05 ($\pm 0,45$)	4,56 ($\pm 0,23$)	7,54 ($\pm 0,39$)
CON	2,93 ($\pm 0,37$)	7,89 ($\pm 0,50$)	5,56 ($\pm 0,55$)	7,59 ($\pm 0,57$)	7,73 ($\pm 0,60$)	9,00 ($\pm 0,50$)	8,18 ($\pm 0,340$)	7,34 ($\pm 0,29$)

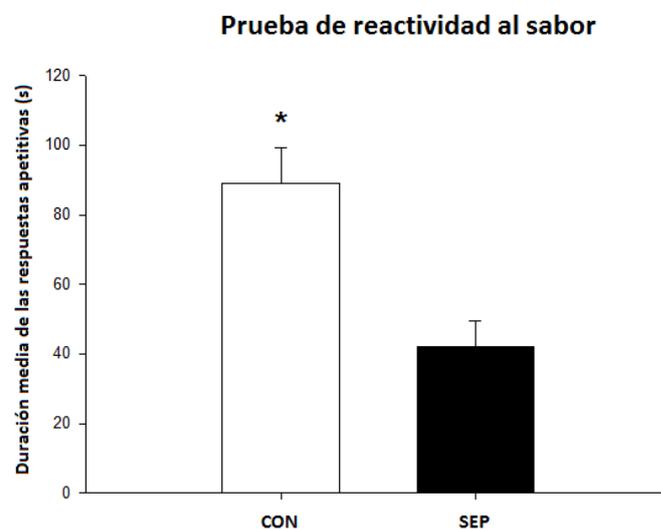
Nota. Consumo medio (ml) de la solución gustativa correspondiente a cada grupo durante la fase de condicionamiento. El grupo CON (presentación conjunta) recibió limón + sacarosa en los ensayos Tipo A y agua en los ensayos Tipo B. El grupo SEP (presentación separada) recibió limón en los ensayos Tipo A y sacarosa en los ensayos Tipo B. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

6.2.3.2. Prueba de reactividad al sabor

Respuestas apetitivas

En cuanto a la prueba de reactividad oro-facial al sabor y a diferencia del primer experimento donde se empleó sacarina para el desarrollo de la preferencia condicionada por la solución de limón, en la Figura 5b podemos observar que el grupo CON muestra un número más elevado de respuestas apetitivas ante la infusión de limón. La comparación de medias realizada mediante una prueba T-test para muestras independientes confirmó que la diferencia entre los grupos en cuanto al número de reacciones apetitivas fue estadísticamente significativa [$t_{(21)} = -3,802$; $p = 0,001$].

Figura 5b. Experimento 2: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad

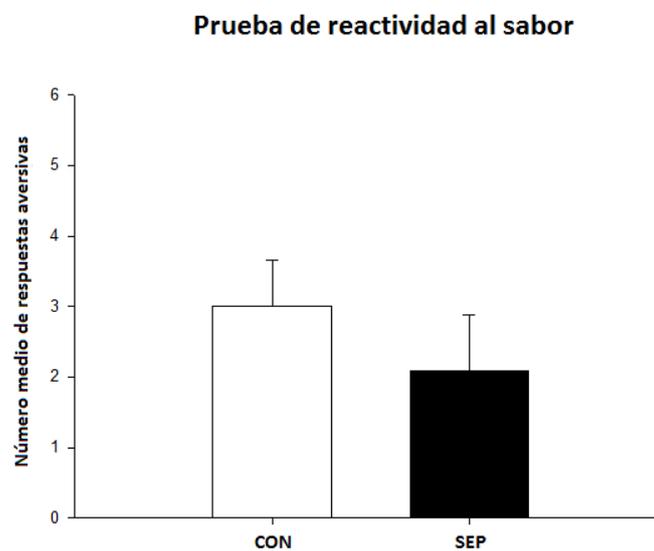


Nota. Duración media (en segundos) de las respuestas apetitivas durante la infusión de la solución de limón para cada grupo, grupo CON (presentación conjunta) y grupo SEP (presentación separada), en la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Respuestas aversivas

Por el contrario, el análisis de las respuestas aversivas mostradas por los animales durante la prueba de reactividad al limón puso de manifiesto que, como se puede apreciar en la Figura 5c, no hubo diferencias significativas entre los grupos en este tipo de reacciones oro-faciales [$t_{(21)} = -0,866$; $p = 0,396$].

Figura 5c. Experimento 2: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad



Nota. Número medio de respuestas aversivas o de rechazo al ácido cítrico mostradas por los sujetos de ambos grupos, SEP (presentación separada) y CON (presentación conjunta), durante la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Si examinamos estos resultados a la luz de los obtenidos en el Experimento 1, se pone de manifiesto que la valoración hedónica de una solución que se ha condicionado con sacarosa podría estar más relacionada con la anticipación de las consecuencias nutritivas de su ingesta y no tanto con la transferencia de las propiedades sensoriales (su sabor dulce) de la sustancia gustativa utilizada para desarrollar dicha preferencia. Esto indicaría que el mecanismo de aprendizaje sabor-nutriente podría primar sobre el mecanismo sabor-sabor a la hora de desarrollarse la preferencia condicionada con sacarosa como E1.

Los valores promedios para las diferentes categorías de respuestas oro-faciales analizadas en la prueba de reactividad facial se muestran en la Tabla 5c.

Tabla 5c. Experimento 2: Respuestas registradas en la prueba de reactividad al sabor

Grupo	Respuestas Apetitivas	Respuestas Aversivas
SEP	42,17 ($\pm 7,29$)	2,08 ($\pm 0,81$)
CON	89,02 ($\pm 10,11$)	3,00 ($\pm 0,61$)

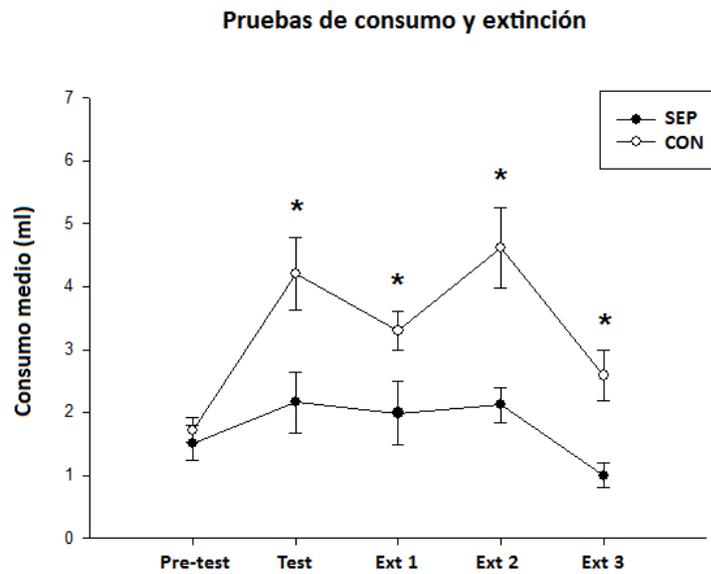
Nota. Duración media de las respuestas apetitivas y aversivas mostradas por los animales de cada grupo, SEP (presentación separada) y CON (presentación conjunta), ante la infusión de limón en la prueba de reactividad al sabor. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

6.2.3.3. Prueba de extinción

Por último y respecto a las prueba de extinción llevada a cabo una vez desarrollada la preferencia por el ácido cítrico (por su presentación conjunta con sacarosa durante el condicionamiento), observamos un patrón de consumo de limón que sigue la misma pauta que en el Experimento 1, manteniéndose la diferencia observada en el test entre el grupo CON y el grupo SEP a lo largo de las 3 pruebas posteriores, tal y como se puede apreciar en la Figura 5d. Un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas y dos factores, número de Sesiones y Grupo de sujetos (incluyendo los consumos de los 3 días posteriores al test y también el consumo del día de prueba en el factor sesiones), mostró nuevamente un efecto significativo del factor Sesiones [$F_{(3,63)} = 5,354$; $p = 0,002$] y del factor Grupo [$F_{(1,21)} = 29,220$; $p < 0,001$] pero no así de la interacción [$F < 1$]. El ajuste de Bonferroni para el análisis de las comparaciones múltiples confirmó esta fuerte resistencia a la extinción indicando que las diferencias entre los grupos, en cuanto al consumo de limón, fueron estadísticamente significativas, no solo en la prueba de preferencia, sino también en las distintas sesiones de extinción [$F_{\underline{2}(1,21)} \geq 4,703$; $ps \leq 0,042$].

Los consumos medios de la solución de limón de cada grupo en las diferentes sesiones de prueba se muestran en la Tabla 5d.

Figura 5d. Experimento 2: Prueba de extinción



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), durante la prueba inicial (Pre-test), la prueba de preferencia (Test) y la prueba de extinción (Ext 1, 2 y 3). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 5d. Experimento 2: Consumos registrados durante la prueba de extinción

Grupo	Extinción 1	Extinción 2	Extinción 3
SEP	1,99 (\pm 0,50)	2,12 (\pm 0,28)	1,00 (\pm 0,20)
CON	3,30 (\pm 0,30)	4,61 (\pm 0,64)	2,59 (\pm 0,41)

Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), durante la prueba de extinción. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

6.3. Experimento 3

Preferencia condicionada usando maltodextrina como EI

En este tercer experimento de la serie se utilizó una solución de maltodextrina como EI para el desarrollo de una preferencia condicionada por el ácido cítrico. La maltodextrina es un polímero de glucosa que carece del componente dulce de las soluciones empleadas en los dos primeros experimentos (sacarina y sacarosa). Sin embargo, la maltodextrina posee el mismo valor calórico que la sacarosa (4 kilocalorías por gramo), lo que la convierte en una sustancia idónea para evaluar el papel del aprendizaje sabor-nutriente durante la adquisición de una preferencia condicionada. En esta ocasión, la mitad de los sujetos del estudio recibió la solución de ácido cítrico (EC) mezclada con maltodextrina (EI) durante el condicionamiento, mientras la otra mitad recibió el ácido cítrico y la maltodextrina por separado en diferentes sesiones. Al igual que en los experimentos previos, se espera que en el grupo con presentación simultánea de los sabores (Grupo CON) se produzca un aumento en la preferencia por el limón en comparación con el grupo que recibe la exposición al limón y la maltodextrina por separado o de forma independiente (Grupo SEP).

6.3.1. Sujetos y soluciones

Los sujetos empleados en este experimento fueron 20 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*), de aproximadamente 90 días de edad, procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo. El peso medio de los animales del inicio del experimento fue de 301 gramos (rango 253-350 g). A su llegada al laboratorio fueron alojados de forma individual en jaulas de PVC y mantenidos en las mismas condiciones de alimentación y ambientales (temperatura y humedad) que en los experimentos anteriores (ver materiales y métodos del capítulo 5).

En este experimento se utilizó como estímulo gustativo (EC), al igual que en experimentos anteriores, una solución de ácido cítrico diluido en agua destilada al 3% de concentración. Como EI se utilizó una solución de maltodextrina (Dextrin Type II, ICN Biomedicals) diluida en agua destilada al 8%.

6.3.2. Procedimiento

Como se muestra en la Tabla 6, este experimento se llevó a cabo siguiendo un procedimiento idéntico al de los dos anteriores.

En primer lugar y tras la fase previa de privación de agua, los animales se asignaron a dos grupos, el Grupo CON (n=10), que recibió la solución de limón de forma conjunta con maltodextrina durante el condicionamiento, y el Grupo SEP (n=10), que recibió ambas soluciones por separado.

Una prueba de consumo (pre-test) de 5 minutos para determinar la preferencia inicial por el limón frente a agua precedió a la fase de condicionamiento.

El entrenamiento de la preferencia se desarrolló siguiendo el mismo procedimiento experimental que en los dos experimentos previos, pero utilizando una solución de maltodextrina como EI. Para que el aporte calórico de la solución de maltodextrina fuese comparable al de la solución de sacarosa empleada en el Experimento 2, se optó por una concentración del 8% de maltodextrina en agua destilada. Durante las sesiones de condicionamiento (4 ciclos de dos días cada uno), el Grupo SEP recibió las soluciones de ácido cítrico y de maltodextrina los días primero y segundo de cada ciclo de entrenamiento. Por su parte, los sujetos del Grupo CON recibieron el compuesto formado por ambas soluciones (limón + maltodextrina) el primer día de cada ciclo de condicionamiento y agua en la segunda sesión de cada uno.

Posteriormente, tras una prueba de elección de idénticas características al pre-test y con el objetivo de evaluar los cambios en la preferencia por el ácido cítrico, los animales fueron implantados con las cánulas intraorales. Recuperados de la intervención quirúrgica se realizó la prueba de reactividad al sabor.

Para finalizar el experimento, al igual que en los anteriores de esta serie, se realizaron las correspondientes 3 sesiones de extinción en las mismas condiciones que la prueba de preferencia condicionada.

Tabla 6. Diseño del Experimento 3

Grupo	Pre-test	Entrenamiento x 4		Test	Canulación	TRT	Extinción x 3
SEP	Agua	Limón	Maltodextrina	Agua	Implantación de cánula en la cavidad oral	3 ml Limón IO	Agua Vs Limón
CON	Limón	Limón + Maltodextrina	Agua	Limón			

Nota. SEP: presentación por separado; CON: presentación conjunta; TRT: Test de reactividad al sabor; IO: administración intraoral.

6.3.3. Resultados

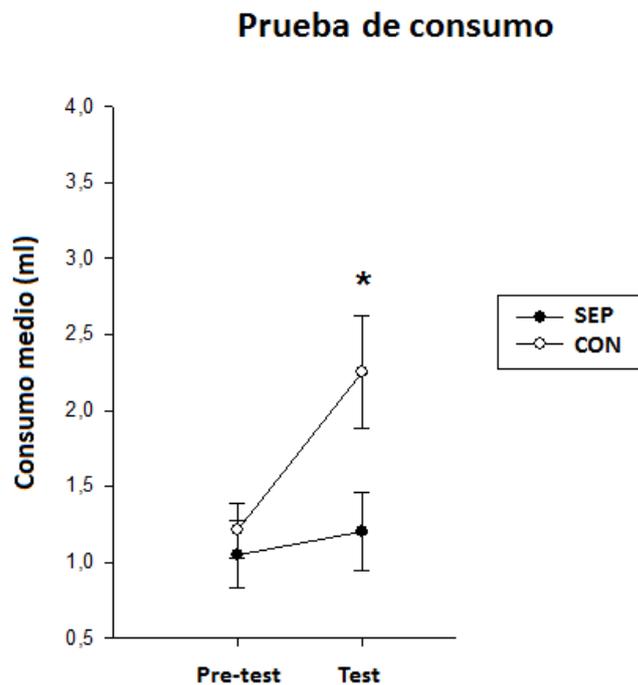
6.3.3.1. Prueba de consumo

Como muestra la Figura 6a, la cantidad de limón consumida durante la prueba inicial (pre-test) fue similar para ambos grupos, CON y SEP. En cambio, tras el condicionamiento, el consumo de esta solución aumentó en el Grupo CON indicando el desarrollo de la preferencia condicionada. Cabe señalar que, aun cuando el volumen de solución consumida en la prueba fuese inferior al registrado en los experimentos anteriores, sigue un patrón similar, indicando que la experiencia conjunta de ácido cítrico y maltodextrina provocó un incremento en la preferencia por el limón. Un ANOVA de medidas repetidas con los consumos recogidos en ambas Sesiones (factor intra-sujetos) y el Grupo (factor inter-sujetos) como variables confirmó esta impresión, es decir, hubo un efecto estadísticamente significativo del factor Sesiones [$F_{(1,18)} = 5,234$; $p = 0,034$] y del factor Grupo [$F_{(1,18)} = 4,843$; $p = 0,041$]. Sin embargo, la interacción Sesiones x Grupo no fue significativa [$F_{(1,18)} = 2,928$; $p = 0,104$]. Aun así, el análisis de las comparaciones múltiples en base al ajuste de Bonferroni reveló que no

hubo diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto al consumo de limón durante la prueba inicial [$F < 1$], pero sí las hubo en la prueba de elección realizada tras el condicionamiento [$F_{(1,18)} = 5,345$; $p = 0,033$]. Estos datos confirman que la exposición conjunta a limón y maltodextrina durante el condicionamiento fue eficaz para producir la preferencia condicionada por la solución de ácido cítrico.

En la Tabla 7a, se muestran los consumos de limón correspondientes a estas dos pruebas. Los consumos registrados en la fase de condicionamiento se muestran también en la Tabla 7b.

Figura 6a. Experimento 3: Prueba de consumo



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para ambos grupos, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), en cada la pruebas de consumo inicial (Pre-test) y en la prueba de consumo realizada tras el condicionamiento (Test). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 7a. Experimento 3: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo

Grupo	Pre-test	Test
SEP	1,05 ($\pm 0,21$)	1,20 ($\pm 0,26$)
CON	1,21 ($\pm 0,17$)	2,25 ($\pm 0,37$)

Nota. Consumo medio de la solución de limón (ml) para cada grupo, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), durante la prueba de preferencia inicial (Pre-test) y la prueba tras el condicionamiento (Test). Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 7b. Experimento 3: Consumos registrados durante la fase de condicionamiento

Grupo	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
SEP	1,84 ($\pm 0,21$)	3,70 ($\pm 0,25$)	2,69 ($\pm 0,38$)	5,97 ($\pm 0,25$)	3,39 ($\pm 0,25$)	6,29 ($\pm 0,25$)	4,33 ($\pm 0,21$)	6,43 ($\pm 0,32$)
CON	1,90 ($\pm 0,26$)	6,90 ($\pm 0,42$)	3,90 ($\pm 0,26$)	6,23 ($\pm 0,28$)	5,53 ($\pm 0,39$)	7,33 ($\pm 0,38$)	4,95 ($\pm 0,333$)	6,20 ($\pm 0,29$)

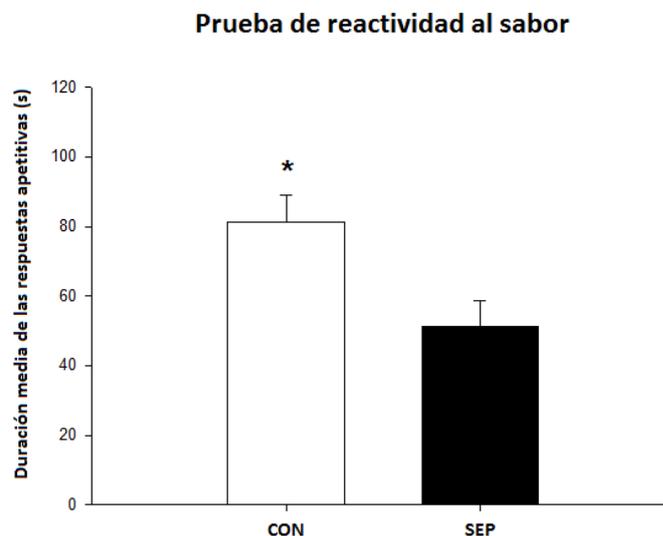
Nota. Consumo medio (ml) de la solución gustativa correspondiente a cada grupo durante la fase de condicionamiento. El grupo CON (presentación conjunta) recibió limón + maltodextrina en los ensayos Tipo A y agua en los ensayos Tipo B. El grupo SEP (presentación separada) recibió limón en los ensayos Tipo A y maltodextrina en los ensayos Tipo B. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

6.3.3.2. Prueba de reactividad al sabor

Respuestas apetitivas

En cuanto a la prueba de reactividad al sabor realizada tras el condicionamiento, en la Figura 6b se muestran las reacciones apetitivas de los animales durante la infusión intraoral de limón. Como se puede observar, cuando se utiliza maltodextrina como El para el desarrollo de la preferencia condicionada, el grupo CON muestra un elevado número de respuestas apetitivas o de ingesta en comparación con el Grupo SEP. Una prueba T-test de comparación de medias para muestras independientes mostró que la diferencia existente entre los dos grupos fue estadísticamente significativa [$t_{(18)} = -2,681$; $p = 0,015$].

Figura 6b. Experimento 3: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad

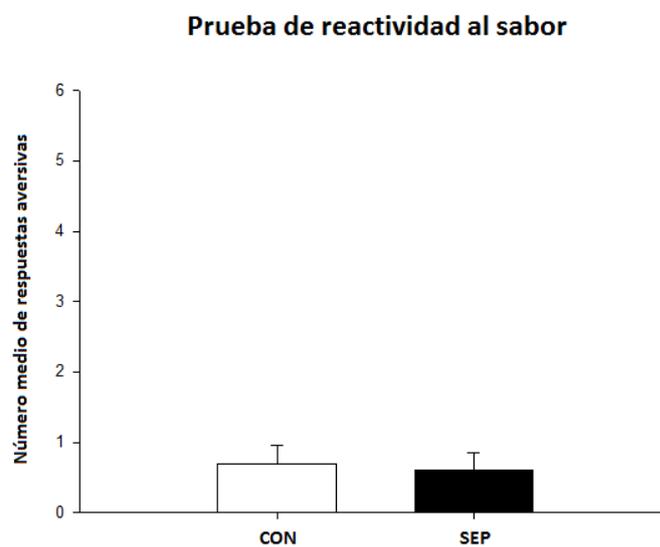


Nota. Duración media (en segundos) de las respuestas apetitivas durante la infusión de la solución de limón para cada grupo, grupo CON (presentación conjunta) y grupo SEP (presentación separada), en la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Respuestas aversivas

Nuevamente, y como se aprecia en la Figura 6c, durante esta prueba los animales apenas mostraron respuestas aversivas durante la infusión del fluido. La comparación T-test realizada con estos valores mostró la ausencia de diferencias significativas entre los grupos [$t_{(18)} = -0,268$; $p = 0,791$].

Figura 6c. Experimento 3: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad



Nota. Número medio de respuestas aversivas o de rechazo al ácido cítrico mostradas por los sujetos de ambos grupos, SEP (presentación separada) y CON (presentación conjunta), durante la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Así pues, los resultados de la prueba de reactividad al limón cuando se ha producido una preferencia condicionada utilizando maltodextrina como EI, son similares a los obtenidos utilizando sacarosa para el mismo fin, lo que confirma que, cuando existe un componente nutritivo que media en el desarrollo de una preferencia, el incremento en el valor hedónico o palatabilidad de la solución condicionada parece estar estrechamente ligado a la formación de una asociación sabor-nutriente.

Los valores promedios para las diferentes categorías de respuestas orofaciales analizadas en la prueba de reactividad al sabor se muestran en la Tabla 7c.

Tabla 7c. Experimento 3: Respuestas registradas en la prueba de reactividad al sabor

Grupo	Respuestas Apetitivas	Respuestas Aversivas
SEP	51,13 ($\pm 7,58$)	0,60 ($\pm 0,26$)
CON	81,19 ($\pm 7,81$)	0,70 ($\pm 0,26$)

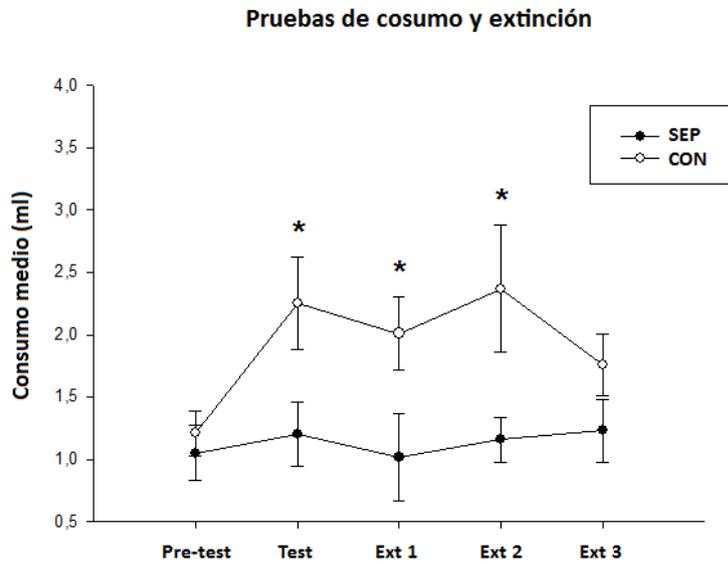
Nota. Duración media de las respuestas apetitivas y aversivas mostradas por los animales de cada grupo, SEP (presentación separada) y CON (presentación conjunta), ante la infusión de limón en la prueba de reactividad al sabor. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

6.3.3.3. Prueba de extinción

Finalmente, en la prueba de extinción realizada tras el condicionamiento de la preferencia por el ácido cítrico, se observa un patrón de consumo de limón similar a los dos experimentos anteriores de esta serie, es decir, un descenso en el consumo de la solución previamente condicionada indicando la extinción de la preferencia gustativa. No obstante, cuando se emplean para el condicionamiento de la preferencia las soluciones de sacarina y sacarosa (ambas con un componente sensorial y gustativo muy importante, debido a su sabor dulce), se aprecia una diferencia mayor entre los grupos en cuanto al consumo de la solución condicionada, lo que puede fomentar una mayor resistencia a la extinción (ver Figura 6d). Un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas utilizando las Sesiones (consumos del día de prueba y de los tres ensayos de extinción) como factor intra-sujetos y el Grupo como variable inter-sujetos, confirmó esta impresión; se obtuvo un efecto significativo del factor Grupo [$F_{(1,18)} = 20,413$; $p < 0,001$], pero no hubo efecto de las Sesiones ni tampoco una interacción significativa Sesiones x Grupo [$F_s < 1$]. El ajuste de Bonferroni para el análisis de las comparaciones múltiples confirmó, al contrario que en los experimentos anteriores, que las diferencias entre los grupos en cuanto al consumo de limón sólo fueron estadísticamente significativas en el ensayo de prueba y en los dos primeros ensayos de extinción [$F_{\underline{s}(1,18)} \geq 4,646$; $p_s \leq 0,045$], pero no así en la última sesión de extinción [$F_{(1,18)} = 2,190$; $p = 0,156$].

La Tabla 7d muestra las medias de consumo de la solución de limón de cada grupo en las diferentes pruebas realizadas.

Figura 6d. Experimento 3: Prueba de extinción



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), durante la prueba inicial (Pre-test), la prueba de preferencia (Test) y la prueba de extinción (Ext 1, 2 y 3). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 7d. Experimento 3: Consumos registrados en la prueba de extinción

Grupo	Extinción 1	Extinción 2	Extinción 3
SEP	1,02 (\pm 0,35)	1,16 (\pm 0,18)	1,23 (\pm 0,25)
CON	2,01 (\pm 0,29)	2,37 (\pm 0,51)	1,76 (\pm 0,25)

Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo, CON (presentación conjunta) y SEP (presentación por separado), durante la prueba inicial (Pre-test), la prueba de preferencia (Test) y la prueba de extinción (Ext 1, 2 y 3). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

6.4. Discusión de la serie experimental

Los resultados obtenidos en el primer experimento muestran que la experiencia conjunta del limón con la solución dulce de sacarina fue eficaz para promover una fuerte preferencia condicionada por ese sabor, como muestra el incremento a lo largo de los ensayos del consumo de limón parte del grupo que recibió las soluciones de limón y sacarina de forma conjunta durante el entrenamiento (Grupo CON). Por otro lado, la prueba de reactividad al sabor mostró que el incremento en la preferencia por el limón (ingesta de la solución) no se vio acompañado de un aumento en el número de respuestas apetitivas producidas por la infusión de dicha solución, lo que sugiere que la preferencia gustativa desarrollada puede estar determinada exclusivamente por la asociación del sabor a limón con las propiedades sensoriales (dulzor) de la sacarina y que no supone un cambio en la valoración hedónica de dicho sabor. Finalmente, la prueba adicional de extinción mostró la robustez del aprendizaje de la preferencia dado que, con sucesivas exposiciones no reforzadas a la solución condicionada, el incremento en el consumo de la solución de limón por parte del grupo CON se mantuvo en el tiempo, dejando patente una significativa resistencia a la extinción.

Los resultados del segundo experimento indican que, dado el aumento en el consumo de la solución de limón por parte del Grupo CON tras el condicionamiento, la experiencia conjunta del limón con la solución de sacarosa incentivó el desarrollo de una fuerte preferencia condicionada por el sabor del limón. Por otra parte, la prueba de reactividad al sabor mostró que el incremento en la preferencia por el limón ahora sí se vio acompañado de un aumento en el número de respuestas apetitivas producidas por la infusión intraoral de la solución de ácido cítrico. Este dato sugiere

que la preferencia gustativa desarrollada con sustancias que poseen un alto valor calórico o nutritivo como la sacarosa conlleva la transferencia de sus cualidades hedónicas a la solución con la que fue emparejada previamente, el ácido cítrico en nuestro caso. También, al igual que en el primer experimento con sacarina, la robustez de la preferencia condicionada queda patente en la prueba de extinción final, reflejando una resistencia significativa a la extinción; el incremento en el consumo de la solución de limón por parte del grupo CON se mantuvo en el tiempo incluso con varias exposiciones no reforzadas a la solución condicionada.

Por su parte, los resultados del tercer experimento indican que, aunque no exista un componente sensorial y gustativo relevante (sabor dulce), como en los experimentos anteriores, la experiencia conjunta del limón con la maltodextrina fomentó también el desarrollo de una preferencia condicionada por el limón, lo que se confirmó en la prueba con un incremento en el consumo de esta solución por parte del Grupo CON, que experimentó ambos sabores de forma conjunta durante el entrenamiento. En línea con lo anterior, la prueba de reactividad al sabor mostró un incremento significativo en el número de respuestas apetitivas mostradas por los animales durante la infusión intraoral de la solución cítrica. Dado que la maltodextrina carece del sabor dulce que caracteriza a los estímulos incondicionados de los dos primeros experimentos (sacarina y sacarosa), la preferencia condicionada por el limón que se ha desarrollado en este experimento parece estar más relacionada con un proceso de aprendizaje sabor-nutriente. Además, la transferencia de las propiedades hedónicas de la maltodextrina (EI) a la solución de ácido cítrico (EC), observada a través del test de reactividad al sabor, apoya esta idea. Por último, cabe señalar que, a diferencia de los experimentos anteriores, la resistencia a la extinción de la preferencia

condicionada con maltodextrina fue menor; es decir, los efectos del aprendizaje resultan más duraderos cuando se induce la preferencia con sustancias con alta palatabilidad, como en el caso de sacarina o sacarosa de marcado sabor dulce.

En conjunto, esta primera serie experimental permitió constatar que la experiencia conjunta del sabor ácido del limón con una solución altamente agradable en cuanto a su palatabilidad (sacarina) y/o con propiedades nutritivas (sacarosa o maltodextrina) durante el condicionamiento, incrementa el consumo de la solución de limón al desarrollarse una fuerte preferencia condicionada por ese sabor, en comparación con sujetos que han recibido las soluciones gustativas correspondientes por separado. La utilización de este tipo de control con exposición a los sabores por separado (grupos SEP) permitió además comprobar si la preferencia adquirida por los grupos con experiencia conjunta (grupos CON) se debía a su emparejamiento con las sustancias utilizadas como estímulos incondicionados o a un efecto derivado de la mera exposición repetida a los sabores. Como se mencionó en la parte introductoria de la tesis, la familiarización con los sabores puede producir también un aumento en la preferencia por los mismos (Birch, Gunder, Grimm-Thomas y Laing, 1998; Zajonc, 1968). Además, cuando el sabor de la solución empleada como estímulo incondicionado para el desarrollo de la preferencia presenta unas cualidades sensoriales y gustativas significativas (sabor dulce), como en el caso de la sacarina y la sacarosa, este incremento en el consumo de la solución condicionada se muestra, si cabe, más evidente.

El hallazgo principal de esta serie de estudios es que, como demuestra la prueba de reactividad al sabor realizada, la transferencia de las propiedades hedónicas del EI al EC, patente a través del análisis de las respuestas apetitivas producidas por la

infusión intraoral de la solución de ácido cítrico, sólo tiene lugar cuando media el componente nutritivo en la solución reforzante, como es el caso de la sacarosa y la maltodextrina.

Finalmente, los resultados de la prueba de extinción confirman la robustez del aprendizaje de una preferencia gustativa condicionada, sobre todo cuando la solución empleada para desarrollar tal preferencia presenta unas cualidades sensoriales gustativas (como el sabor de la solución) que le confieren una marcada palatabilidad.

Así pues, el uso de la técnica de reactividad al sabor, de forma conjunta con las pruebas de consumo, pone de manifiesto la diferenciación de los distintos mecanismos de aprendizaje que subyacen a la formación de las preferencias gustativas condicionadas (aprendizaje sabor-sabor y sabor-nutriente). Además, a partir de los resultados de los experimentos recogidos aquí, podemos decir que la técnica de reactividad al sabor constituye una herramienta eficaz para el análisis del valor hedónico de las soluciones empleadas en este paradigma, destacando que la transferencia de estas cualidades hedónicas de la solución EI a la solución EC responde a una anticipación de las consecuencias nutritivas presentes en la solución utilizada como EI, que son experimentadas por los sujetos al proporcionarse ambas soluciones de forma conjunta durante el entrenamiento. Esta situación pone de manifiesto que los cambios en la valoración hedónica de los fluidos durante el aprendizaje de preferencias gustativas puede depender en mayor medida de la formación de una asociación sabor-nutriente que de una asociación sabor-sabor.

Capítulo 7

**Efecto de la devaluación del reforzador
sobre la preferencia condicionada**

Una vez evaluado en la serie experimental anterior el efecto básico de preferencia condicionada por el sabor y sus bases asociativas con la tecnología de reactividad facial, resulta de interés para los objetivos de la Tesis doctoral determinar si la devaluación del reforzador tras el condicionamiento de la preferencia gustativa modifica las propiedades hedónicas adquiridas por el sabor condicionado. En este sentido, si se devalúan las sustancias gustativas (sacarina, sacarosa y maltodextrina) utilizadas como estímulo incondicionado para inducir la preferencia por el sabor a limón, debería producir una reducción en el consumo de esta solución y de sus propiedades hedónicas evaluadas mediante la reactividad al sabor. La reducción del valor reforzante del EI se llevará a cabo mediante la inyección de cloruro de litio (LiCl), una sustancia inductora de malestar gástrico que provoca el rechazo del sabor con el que se asocia, un fenómeno denominado aversión condicionada al sabor (García, 1989; Klosterhalfen y Klosterhalfen, 1985; ver también Reilly y Schatchman, 2009, para una revisión).

En esta serie experimental se siguió el mismo procedimiento que en los estudios anteriores, con la salvedad de devaluar el reforzador tras el condicionamiento de la preferencia gustativa. Para ello, en cada experimento de la serie, se proporcionó durante el condicionamiento a los sujetos experimentales la solución de ácido cítrico (EC) combinada con el reforzador o solución gustativa correspondiente (sacarina, sacarosa y maltodextrina). Tras el desarrollo de la preferencia gustativa por el sabor a limón se llevó a cabo la fase de devaluación, asociando las soluciones de sacarina (Experimento 4), sacarosa (Experimentos 5) o maltodextrina (Experimentos 6) con inyecciones de cloruro de litio. La prueba de reactividad al sabor y la prueba de extinción posteriores permitieron determinar el efecto de manipulación sobre la

preferencia previamente condicionada por el limón y el cambio en su valoración hedónica o afectiva. Así pues, es de esperar que al reducirse el valor reforzante del EI por su devaluación con litio disminuya la preferencia previamente condicionada, al tiempo que cambie la valoración hedónica del fluido durante la prueba de reactividad al sabor (Baeyens, Eelen, Van den Bergh, y Crombez, 1992). Ahora bien, este efecto podría depender, como se ha visto en la serie anterior, de las cualidades hedónicas de la solución reforzante.

7.1. Experimento 4

Efecto de la devaluación de la sacarina sobre la preferencia condicionada

El objetivo de este cuarto experimento fue determinar, con la metodología de reactividad al sabor, si la preferencia adquirida por una sustancia moderadamente aversiva (ácido cítrico) debido a su asociación con sacarina se ve afectada por la devaluación posterior de la solución reforzante. Para ello, durante la fase de condicionamiento la mitad de los sujetos (grupos CON-Litio y CON-Salino) recibieron la solución de ácido cítrico (EC) combinada con sacarina (EI) mientras que los restantes animales (grupos SEP-Litio y SEP-Salino) fueron expuestos en días sucesivos a las soluciones de limón y sacarina por separado. Tras esta fase, una prueba de elección entre el ácido cítrico (EC) y agua para evaluar la magnitud de la preferencia condicionada, dio paso a la fase de devaluación del reforzador. En esta fase, los sujetos de la condición de devaluación (grupos CON-Litio y SEP-Litio) recibieron inyecciones de cloruro de litio tras consumir la solución de sacarina; por su parte, los sujetos de la condición de control (grupos CON-Salino y SEP-Salino) recibieron, tras la exposición a la sacarina, inyecciones de salino isotónico. La hipótesis de partida es que si la preferencia condicionada por el limón al consumirlo conjuntamente con sacarina obedece, como se vio en el Experimento 1, a la formación de una asociación sabor-sabor (dado que el valor reforzante de la sacarina reside en su cualidad dulce), la devaluación de la sacarina debería reducir la preferencia previamente establecida por el limón en términos de consumo. Por el contrario, no debería afectar a la respuesta hedónica al sabor dado que la preferencia gustativa inducida con sacarina no parece modificar las cualidades hedónicas de la solución con la que se asocia.

7.1.1. Sujetos y soluciones

Este experimento, debido a la disponibilidad de animales en el momento de su realización, se llevó a cabo en dos tandas iguales con 20 ratas cada una, la primera correspondiente a la condición con devaluación y la segunda a la condición de control. Se emplearon en total 40 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*) procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Los animales de la primera tanda tenían al comienzo del experimento tres meses de edad y un peso medio de 292 gramos (rango 224-369 g); el peso medio de los sujetos de la segunda tanda fue de 261 gramos (rango 219-323 g). A su llegada al laboratorio, los animales fueron alojados en las condiciones de iluminación y temperatura ambiente descritas en el apartado sobre materiales y método general (capítulo 5).

Como estímulo gustativo (EC) se utilizó la misma solución de limón que en el primer experimento de la serie anterior, obtenida al diluir ácido cítrico en agua destilada a una concentración del 3%. Para inducir la preferencia se empleó como El una solución de sacarina diluida también en agua destilada al 0,1%. La solución de cloruro de litio (0.15M) utilizada para devaluar la sacarina se administró a una dosis de 20 ml/kg de peso corporal. Los animales de la condición de control fueron inyectados con una dosis equivalente de salino isotónico (0,9%).

7.1.2. Procedimiento

Los aspectos de procedimiento comunes a los tres experimentos de esta serie se describieron en la sección del método general (capítulo 5), por lo que aquí solamente se detallarán las manipulaciones experimentales específicas realizadas en el presente experimento cuyo diseño se muestra en la Tabla 8. El estudio constó de varias fases que se describen a continuación:

En primer lugar, se sometió a los animales al programa de privación de agua establecido para todos los experimentos del estudio (los animales tenían acceso a agua durante 60 minutos diarios al finalizar las sesiones experimentales). Seguidamente recibieron 4 sesiones de exposición limitada a agua (las 2 primeras sesiones con una duración total de 10 minutos y las 2 sesiones siguientes con una duración total de 5 minutos) en los tubos calibrados con el fin de familiarizarlos con el procedimiento de bebida. Sobre la base de los consumos de agua registrados en esta fase se asignó a los animales a cuatro grupos de sujetos. Los grupos se conformaron atendiendo al tratamiento experimental que recibirían posteriormente: sujetos que tendrían una exposición diaria a los dos sabores (limón y sacarina) combinados en la misma disolución o presentación conjunta (grupos CON-Litio y CON-Salino) y sujetos que recibirían los dos sabores por separado en días alternos (grupo SEP-Litio y SEP-Salino). Durante el curso del experimento los sujetos tuvieron acceso permanente a la comida de mantenimiento en las jaulas de alojamiento.

Antes de comenzar la fase de condicionamiento, una prueba inicial o pre-test, efectuada en los términos escritos en los experimentos anteriores y en la sección del método general (capítulo 5), permitió evaluar la preferencia incondicionada por el sabor a limón frente a agua.

Las sesiones de condicionamiento consistieron en 4 ciclos de entrenamiento con dos sesiones cada uno. Los sujetos de la condición conjunta (grupos CON-Litio y CON-Salino) recibieron una exposición a los dos sabores (limón y sacarina) mezclados en la misma disolución el primer día de cada ciclo, mientras que el segundo día recibieron agua en los tubos de bebida. Los sujetos de la condición separada (grupos SEP-Litio y SEP-Salino) recibieron el primer día de cada ciclo la solución de limón y el segundo día la solución de sacarina.

Una prueba de preferencia (similar al pre-test inicial) entre la solución de limón y agua, realizada al concluir las 8 sesiones de la fase de condicionamiento, permitió determinar si el entrenamiento había sido efectivo para provocar un aumento en la preferencia por el ácido cítrico.

Tras la prueba de preferencia entre la solución de limón y agua, los sujetos de los grupos devaluados (CON-Litio y SEP-Litio) recibieron 2 ciclos de entrenamiento con dos sesiones cada uno (4 sesiones en total). El primer día de cada ciclo las ratas tuvieron acceso en sus jaulas hogar a la solución de sacarina durante 5 minutos seguido de una inyección de LiCl (0.15M a 20 ml/kg). En estas sesiones, los animales de la condición no devaluada (grupos CON-Salino y SEP-Salino) recibieron una inyección de salino (0,9 % a 20 ml/kg) tras la exposición a la solución de sacarina. Durante el segundo día de cada ciclo, todos los animales tuvieron acceso libre a agua en las jaulas de alojamiento para reponerse de los efectos fisiológicos derivados de la inyección de litio. Como se explicó en el capítulo 5 sobre el método general, durante la fase de devaluación se intercambiaron en cada ciclo el lugar de presentación de los tubos de bebida en las jaulas para evitar cualquier efecto de preferencia por una localización en particular.

Tras la fase de devaluación se procedió al implante de las cánulas en la cavidad bucal de los animales de cara a la prueba de reactividad al sabor. Durante el postoperatorio 4 sujetos perdieron la cánula quedando configurados los grupos con los siguientes sujetos cada uno: Grupo CON-Litio (n=10), Grupo SEP-Litio (n=9), Grupo CON-Salino (n=9) y Grupo SEP-Salino (n=8). Tras el período de recuperación de la operación, se llevó a cabo la sesión de habituación al método de administración del fluido para lo cual todos los animales recibieron una infusión intraoral de 1 ml de agua durante 1 minuto (tasa de infusión 1 ml/min) en el aparato de reactividad.

La prueba de reactividad al sabor se realizó al día siguiente y consistió en administrar a todos los sujetos una infusión de 3 ml de la solución de limón durante 3 minutos (tasa de infusión 1 ml/min) a primera hora de la mañana (09:00). Durante este tiempo se grabaron las reacciones oro-faciales de los animales para su posterior reproducción y cuantificación. Además, con el objetivo de determinar la efectividad del procedimiento de devaluación, se realizó en todos los animales una segunda infusión de 3 ml de la solución de sacarina durante 3 minutos (tasa de infusión 1 ml/min) a última hora de la mañana (13:00).

Tabla 8. Diseño del Experimento 4

Grupo	Pre-test	Entrenamiento x 4		Test	Devaluación x 2		Canulación	TRT	Extinción x 3
SEP-Litio		Limón	Sacarina		Sacarina → LiCl		Implantación de cánula en la cavidad oral	3 ml Limón IO	Agua
CON-Litio	Agua	Limón + Sacarina	Agua	Agua		Agua			Vs
SEP-Salino	Limón	Limón	Sacarina	Limón	Sacarina → Salino				3 ml Sacarina IO
CON-Salino		Limón + Sacarina	Agua						

Nota. SEP: presentación por separado de los sabores; CON: presentación conjunta; LiCl: cloruro de litio; TRT: test de reactividad al sabor; IO: infusión intraoral.

7.1.3. Resultados

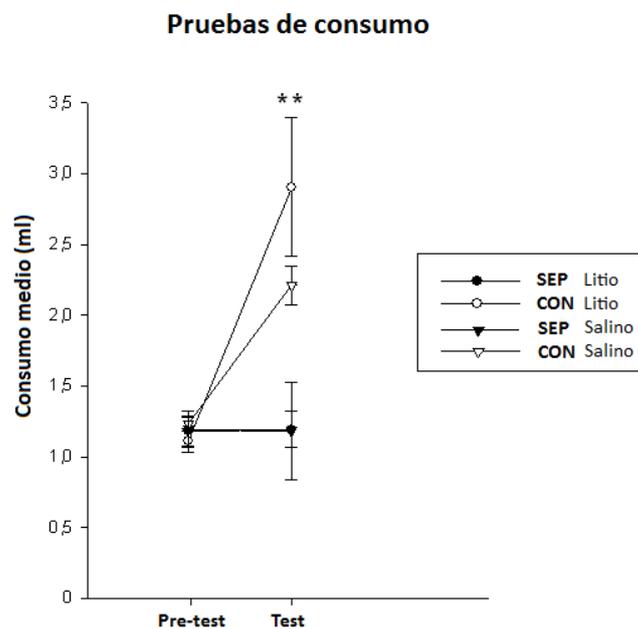
7.1.3.1. Prueba de consumo

La Figura 7a muestra los consumos de la solución de limón de los animales durante la prueba inicial de preferencia incondicionada y durante la prueba realizada tras el condicionamiento. Como se aprecia en la figura, durante la prueba inicial (pre-test) todos los animales mostraron un consumo similar y muy reducido de la solución de limón. Por el contrario, tras la fase de condicionamiento, los sujetos que habían experimentado la exposición conjunta de limón y sacarina (grupos CON-Litio y CON-Salino) mostraron un consumo de limón más elevado que los grupos de control que recibieron la exposición a los dos sabores por separado (grupos SEP-Litio y SEP-Salino). Este resultado indica que la experiencia conjunta con los sabores (limón + sacarina) produjo un incremento en la preferencia condicionada por el limón, replicando el efecto obtenido en el Experimento 1 (Capítulo 6). Un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con el Grupo como factor inter-sujetos y las Sesiones (pre-test y prueba) como factor intra-sujetos, mostró un efecto significativo del factor Sesiones [$F_{(1,32)} = 16,453; p < 0,001$], del factor Grupo y también de la interacción [$F_{(3,32)} \geq 3,850; ps \leq 0,018$]. El análisis de las comparaciones múltiples realizado posteriormente con el ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$) mostró que no hubo diferencias significativas entre los grupos en cuanto al consumo de limón durante la prueba de preferencia inicial [$F < 1$]; en cambio, en la prueba de preferencia realizada tras el condicionamiento el ANOVA arrojó diferencias significativas entre los grupos [$F_{(3,32)} = 5,166; p = 0,005$], destacando que los sujetos de la condición conjunta (Grupos CON-Litio y CON-Salino) tuvieron un consumo de limón significativamente superior al de los sujetos de control (Grupos SEP-

Litio y SEP-Salino). Los análisis anteriores confirman que la experiencia conjunta de limón y sacarina durante el condicionamiento promovió el desarrollo de una preferencia por la solución cítrica que se vio reflejada en la prueba de consumo final realizada tras el entrenamiento.

En la Tabla 9a se muestran los consumos medios de cada grupo en la prueba de preferencia inicial (pre-test) y en la prueba de preferencia final realizada tras el condicionamiento (test). A su vez, la Tabla 9b muestra los consumos de los fluidos registrados durante la fase de condicionamiento.

Figura 7a. Experimento 4: Prueba de consumo



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo durante la prueba inicial de preferencia incondicionada (Pre-test) y en la prueba de preferencia (Test) realizada tras el condicionamiento. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos alude al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento que recibieron durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Litio) o de salino isotónico (Salino).

Tabla 9a. Experimento 4: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo

Grupo	Pre-test	Test
SEP-Litio	1,11 ($\pm 0,12$)	1,12 ($\pm 0,15$)
CON-Litio	1,03 ($\pm 0,10$)	3,12 ($\pm 0,55$)
SEP-Salino	1,12 ($\pm 0,15$)	1,11 ($\pm 0,40$)
CON-Salino	1,16 ($\pm 0,13$)	2,57 ($\pm 0,59$)

Nota. Consumo medio de la solución de limón (ml) para cada grupo durante la prueba de preferencia inicial (Pre-test) y la prueba tras el condicionamiento (Test). Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 9b. Experimento 4: Consumos registrados durante la fase de condicionamiento

Grupo	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
SEP-Litio	3,17 ($\pm 0,19$)	5,30 ($\pm 0,31$)	3,10 ($\pm 0,25$)	7,05 ($\pm 0,36$)	4,14 ($\pm 0,39$)	7,37 ($\pm 0,47$)	5,56 ($\pm 0,70$)	6,76 ($\pm 0,42$)
CON-Litio	2,70 ($\pm 0,29$)	6,76 ($\pm 0,34$)	4,62 ($\pm 0,19$)	8,68 ($\pm 0,19$)	5,98 ($\pm 0,19$)	8,18 ($\pm 0,19$)	6,46 ($\pm 0,19$)	8,01 ($\pm 0,19$)
SEP-Salino	3,53 ($\pm 0,35$)	6,16 ($\pm 0,43$)	2,35 ($\pm 0,28$)	6,06 ($\pm 0,53$)	4,01 ($\pm 0,67$)	7,50 ($\pm 0,51$)	4,80 ($\pm 0,57$)	7,35 ($\pm 0,65$)
CON-Salino	2,68 ($\pm 0,36$)	5,76 ($\pm 0,35$)	3,63 ($\pm 0,36$)	5,74 ($\pm 0,19$)	5,45 ($\pm 0,26$)	6,21 ($\pm 0,33$)	6,80 ($\pm 0,30$)	6,31 ($\pm 0,29$)

Nota. Consumo medio (ml) de la solución gustativa correspondiente a cada grupo durante la fase de condicionamiento. Los grupos CON-Litio y CON-Salino recibieron limón + sacarina en los ensayos Tipo A y agua en los ensayos Tipo B. Los grupos SEP-Litio y SEP-Salino recibieron limón en los ensayos Tipo A y sacarina en los ensayos Tipo B. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

7.1.3.2. Prueba de reactividad al sabor

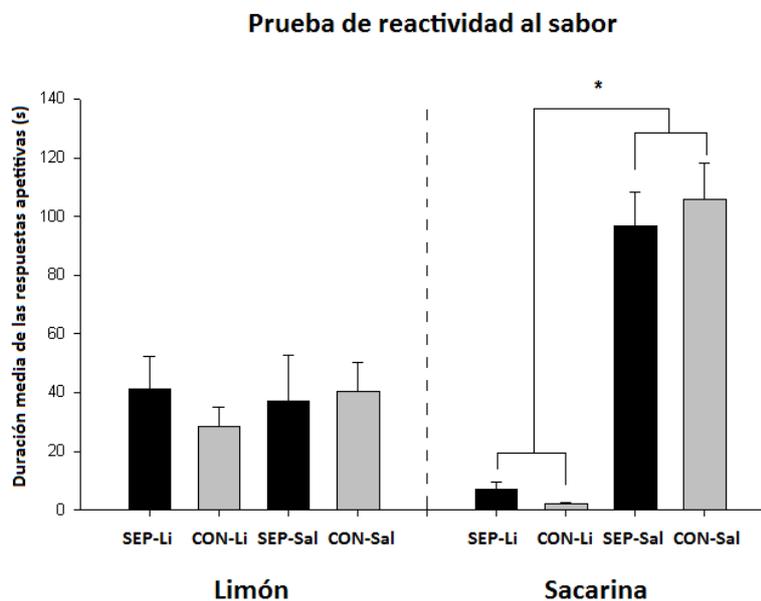
Respuestas apetitivas

Dado que en este experimento (y en los restantes de la serie) se llevó a cabo un procedimiento de devaluación del reforzador tras el desarrollo de la preferencia condicionada, la prueba de reactividad al sabor se realizó tanto con la solución de limón (EC) como con la solución reforzante (sacarina) con el fin de comprobar la efectividad de la devaluación realizada. En la prueba de reactividad con el limón los cuatro grupos de sujetos, con independencia del tratamiento recibido durante el entrenamiento y en la fase de devaluación, tuvieron una tasa similar de respuestas apetitivas durante la infusión de esta solución gustativa, como se muestra en la Figura 7b. Un ANOVA de dos factores (tipo de exposición: conjunta o separada; devaluación: litio o salino) realizado con los datos de esta prueba mostró que no hubo diferencias significativas entre los grupos. Los efectos de los factores Exposición, Devaluación y la Interacción entre ellos no resultaron significativos [$F_{S(1,32)} \leq 0,534$; $ps \geq 0,470$]. Estos datos indican que, a pesar del aumento en el consumo de limón producido tras el condicionamiento en los grupos que recibieron la exposición conjunta a los sabores (Grupos CON-Litio y CON-Salino), la experiencia de devaluación del reforzador no modificó las reacciones apetitivas emitidas por los animales ante el sabor a limón.

En cuanto a la prueba de reactividad con sacarina, los resultados obtenidos (ver Figura 7b) mostraron que la devaluación con LiCl fue eficaz para reducir las cualidades hedónicas de esta solución. Concretamente, los grupos de la condición de devaluación (Grupos CON-Litio y SEP-Litio) mostraban un número muy reducido de respuestas apetitivas respecto a los grupos de la condición no devaluada (Grupo CON-Salino y

SEP-Salino). El análisis de varianza (ANOVA) con dos factores (Exposición y Devaluación) realizado con los datos de esta prueba reveló un efecto significativo del factor Devaluación [$F_{(1,32)} = 141,72; p < 0,001$], pero no del factor Exposición ni de la interacción Exposición x Devaluación [$F_{(1,32)} \leq 0,782; ps \geq 0,383$]. Un ANOVA posterior con el Grupo como factor inter-sujetos mostró que las diferencias entre los cuatro grupos de animales fueron estadísticamente significativas [$F_{(3,35)} = 48,065; p < 0,001$]. Las comparaciones *post hoc* con la prueba Games-Howell ($p < 0,05$) confirmaron que los grupos devaluados (CON-Litio y SEP-Litio) tuvieron una tasa de respuestas apetitivas inferior a la de los grupos no devaluados (CON-Salino y SEP-Salino), que tampoco difirieron entre sí.

Figura 7b. Experimento 4: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad



Nota. Duración media (en segundos) de las respuestas apetitivas realizadas por los animales de cada grupo durante la infusión de limón y de sacarina en la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos refiere al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Li) o de salino isotónico (Sal).

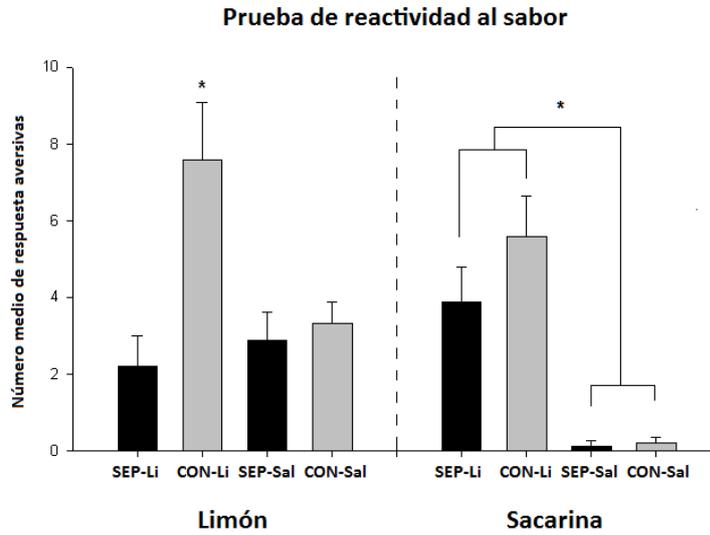
Respuestas aversivas

Como se puede observar en la Figura 7c, el análisis de las reacciones aversivas mostradas por los animales durante la infusión de la sacarina confirmó que la devaluación fue efectiva para reducir su valor hedónico. Los sujetos de la condición devaluada (Grupos CON-Litio y SEP-Litio) mostraron un número mayor de respuestas aversivas a la solución. El ANOVA de dos factores (Exposición y Devaluación) reveló un efecto significativo del factor Devaluación [$F_{(1,32)} = 37,439$; $p < 0,001$], pero no del tipo de Exposición ni de la interacción entre ambos [$F_{5(1,32)} \leq 1,465$; $ps \geq 0,235$]. El ANOVA de un factor (Grupo) realizado posteriormente confirmó que hubo diferencias significativas entre los grupos en cuanto al número medio de respuestas aversivas [$F_{(3,35)} = 13,680$; $p < 0.001$]. La prueba *post hoc* de Games-Howell ($p < 0.05$) reveló que los grupos de la condición devaluada (CON-Lito y SEP-Litio) realizaron más respuestas aversivas que los grupos de control (CON-Salino y SEP-Salino).

Finalmente, el análisis de las reacciones aversivas ante la solución de limón mostró que, una vez devaluada la sacarina, el grupo con experiencia conjunta (Grupo CON-Litio) realizó un número mayor de respuestas aversivas ante el limón (Figura 7c). El ANOVA realizado con los factores Exposición y Devaluación mostró un efecto significativo del factor Exposición y de la interacción Exposición x Devaluación [$F_{5(1,32)} \leq 5,873$; $ps \geq 0,021$]. Un ANOVA de un factor (Grupo) posterior confirmó que las diferencias entre los grupos fueron significativas [$F_{(3,35)} = 6,204$; $p = 0,002$] y la prueba *post hoc* de Games-Howell indicó que el Grupo CON-Litio difería de los otros tres grupos en cuanto al número medio de respuestas aversivas al limón.

En la Tabla 9c se muestran los valores promedio para las dos categorías de respuestas examinadas (apetitivas y aversivas) en los diferentes grupos de sujetos.

Figura 7c. Experimento 4: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad



Nota. Número medio de respuestas aversivas realizadas por los sujetos de cada grupo durante la infusión de limón y de sacarina en la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos refiere al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Li) o de salino isotónico (Sal).

Tabla 9c. Experimento 4: Respuestas registradas en la prueba de reactividad al sabor

Grupo	Limón		Sacarina	
	Apetitivas	Aversivas	Apetitivas	Aversivas
SEP-Litio	44,26 (\pm 11,07)	2,22 (\pm 0,77)	7,17 (\pm 2,38)	3,89 (\pm 0,90)
CON-Litio	22,48 (\pm 6,52)	7,60 (\pm 1,48)	2,16 (\pm 0,45)	5,60 (\pm 1,04)
SEP-Salino	37,29 (\pm 15,29)	2,88 (\pm 0,74)	96,64 (\pm 11,56)	0,13 (\pm 0,12)
CON-Salino	40,25 (\pm 10,14)	3,33 (\pm 0,55)	105,59 (\pm 12,32)	0,22 (\pm 0,23)

Nota. Respuestas apetitivas (duración media en segundos) y aversivas (tasa media de respuestas) mostradas por los animales de cada grupo durante las infusiones de limón y de sacarina en la prueba de reactividad al sabor. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos refiere al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Litio) o de salino isotónico (Salino).

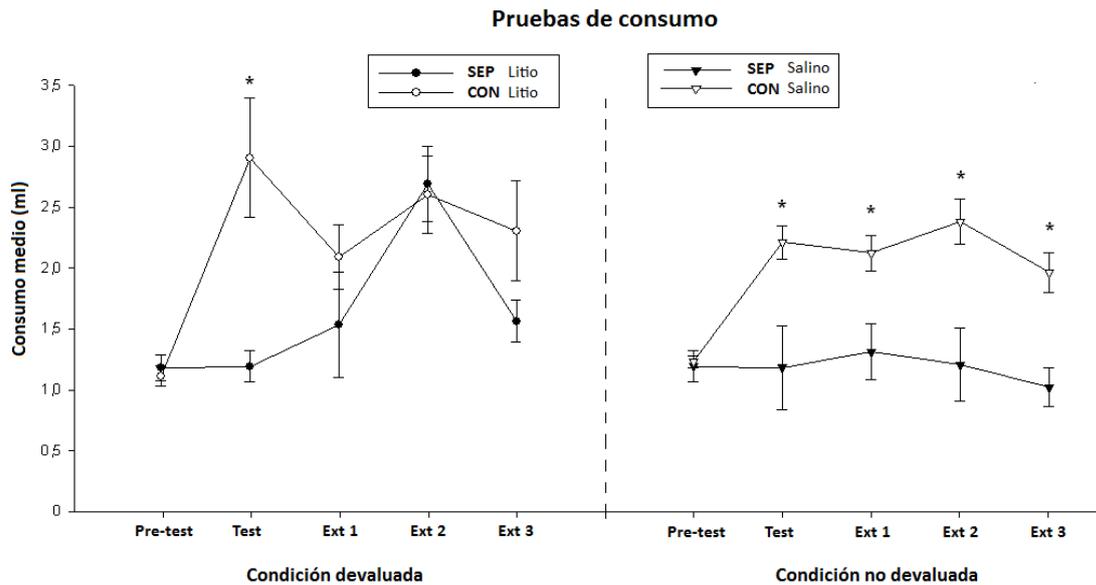
7.1.3.3. Prueba de extinción

En la Figura 7d se muestran los resultados en la fase de extinción de la preferencia condicionada por la solución de limón. Por claridad en la representación visual de los datos, las condiciones experimentales de devaluación y de control salino se muestran por separado. Se han incluido también en las figuras los consumos registrados durante las pruebas de preferencia (pre-test y test) para su comparación. Como se puede apreciar a la derecha de la figura, la diferencia entre los sujetos que recibieron durante el condicionamiento la exposición conjunta a los sabores (Grupo CON-Salino) o por separado (Grupo SEP-Salino) se mantuvo en la condición no devaluada durante las sesiones de extinción. Más concretamente, el mayor consumo de limón mostrado por los sujetos de la condición emparejada en la prueba de preferencia (test en la figura) se mantuvo a lo largo de la fase de extinción replicando lo observado en la misma prueba en el primer experimento de la serie anterior.

En cuanto a la condición devaluada, los resultados no reflejan exactamente las predicciones, probablemente debido al resultado anómalo obtenido en el segundo ensayo de extinción, por el elevado consumo registrado por parte de ambos grupos. El ANOVA de medidas repetidas con los datos de esta fase (incluidos los consumos del día de prueba como un ensayo más de extinción) mostró un efecto significativo del factor Exposición, conjunta o separada [$F_{(3,51)} = 12,539$; $p = 0,001$], y un efecto muy próximo al nivel de significación ($p < 0.05$) de las sesiones de extinción [$F_{(3,96)} = 2,674$; $p = 0,052$] y de la devaluación [$F_{(1,32)} = 3,194$; $p = 0,084$]. Las interacciones entre las variables no resultaron significativas. Aun así, un análisis de la interacción Exposición x Sesiones examinando las comparaciones múltiples con el ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$) mostró diferencias significativas entre las condiciones de exposición conjunta (CON-Litio y

CON-Salino) y por separado (SEP-Litio y SEP-Salino) durante la primera y la tercera sesión de extinción [$F_{5(1,32)} \geq 5,459$; $ps \leq 0,026$]. En la Tabla 9d se muestran los consumos de la solución de limón para cada grupo durante la fase de extinción.

Figura 7d. Experimento 4: Prueba de Extinción



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo durante la prueba inicial (Pre-test), la prueba de preferencia (Test) y la prueba de extinción (Ext 1, 2 y 3). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos alude al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido en la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Litio) o de salino isotónico (Salino).

Tabla 9d. Experimento 4: Consumos registrados durante la prueba de extinción

Grupo	Extinción 1	Extinción 2	Extinción 3
SEP-Litio	1,52 (\pm 0,41)	2,86 (\pm 0,36)	1,55 (\pm 0,20)
CON-Litio	2,17 (\pm 0,31)	2,77 (\pm 0,37)	2,42 (\pm 0,48)
SEP-Salino	1,26 (\pm 0,27)	1,13 (\pm 0,35)	0,92 (\pm 0,19)
CON-Salino	2,21 (\pm 0,32)	2,51 (\pm 0,50)	2,02 (\pm 0,43)

Nota. Consumo medio de la solución de limón (ml) para cada grupo durante la prueba de extinción. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

7.2. Experimento 5

Efecto de la devaluación de la sacarosa sobre la preferencia condicionada

Una vez comprobado, con el procedimiento de devaluación del reforzador, que la preferencia condicionada por una solución gustativa (ácido cítrico) asociada con una solución dulce de sacarina no se acompaña de un cambio en su valoración hedónica, en el Experimento 5 se examina el mismo efecto cuando la preferencia por el limón se ha establecido con una solución dulce de sacarosa, que posee además propiedades nutritivas. En el Experimento 2 de la serie anterior (Capítulo 6) quedó demostrada la eficacia de la sacarosa como estímulo incondicionado para el desarrollo de la preferencia por una solución de limón, observándose un aumento en el consumo de esta solución cítrica tras el condicionamiento y un incremento en la tasa de respuestas apetitivas evocadas con su infusión en la prueba de reactividad. Este resultado sugiere, como ya se comentó, que las preferencias condicionadas con nutrientes se sustentan en la transferencia de las cualidades hedónicas de la solución reforzante al sabor condicionado, es decir, obedecen a la formación de una asociación sabor-nutriente. En este experimento se evalúa si la valoración hedónica adquirida por el sabor durante el condicionamiento disminuye tras la devaluación de la solución reforzante, sacarosa en este caso.

Durante la fase de condicionamiento la mitad de las ratas del experimento (Grupos CON-Litio y CON-salino) recibieron la solución de limón de forma conjunta con sacarosa (la solución reforzante) mientras que los animales restantes (Grupos SEP-Litio y SEP-Salino) recibieron presentaciones de las soluciones de limón y de sacarosa de forma separada. Posteriormente, en la fase de devaluación, la mitad de los sujetos de

cada condición de exposición a los sabores (conjunta o separada) recibieron inyecciones de cloruro de litio tras una nueva exposición a la solución de sacarosa; los sujetos de control fueron inyectados con salino isotónico en la fase de devaluación. Al igual que en el experimento anterior con sacarina, el efecto de la devaluación del reforzador debería reducir, en términos de consumo, la preferencia previamente condicionada por el sabor a limón. Por otro lado, dado que la transferencia del valor hedónico del reforzador al sabor condicionado parece depender del aprendizaje de una asociación sabor-nutriente, como se probó en la primera serie experimental, es de esperar que la devaluación de la sacarosa reduzca las respuestas apetitivas evocadas por el limón al tiempo que aumenten las respuestas aversivas o de rechazo de esta solución.

7.2.1. Sujetos y soluciones

En esta ocasión se emplearon un total de 40 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*), procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Los animales tenían, al comienzo del experimento, alrededor de tres meses de edad y un peso medio de 310 gramos (rango 247-378 g). A su llegada al laboratorio, los animales fueron alojados en las condiciones de iluminación y temperatura ambiente descritas en el apartado sobre materiales y método general (capítulo 5).

Como estímulo gustativo (EC) se utilizó la habitual solución de limón obtenida al diluir ácido cítrico en agua destilada a una concentración del 3%. Al igual que en el Experimento 2, para inducir la preferencia se empleó una solución de sacarosa diluida también en agua destilada al 8% como EI. El cloruro de litio (0.15M) utilizado para devaluar la sacarosa se administró a una dosis de 20 ml/kg de peso corporal, inyectando con una dosis equivalente de salino isotónico (0,9%) a los animales de la condición de control.

7.2.2. Procedimiento

El procedimiento llevado a cabo para el Experimento 5 se realizó en idénticos términos que el experimento anterior, sustituyendo como estímulo incondicionado la solución de sacarina por una solución de sacarosa. Dado que los aspectos comunes al resto de experimentos se describen en la sección de material y método (Capítulo 5), las fases que se muestran en la Tabla 10 se describen de forma somera a continuación:

Después de emplazar a los animales en el habitual programa de privación de agua establecido para todos los experimentos (restricción de agua a 60 minutos diarios y 4 sesiones de exposición limitada en los tubos calibrados) los animales fueron asignados a los 4 grupos en base al consumo registrado. Los grupos se conformaron en función el tratamiento recibido en la fase de condicionamiento: sujetos con exposición a ambos sabores (limón y sacarosa) combinados en la misma disolución o presentación conjunta (grupos CON-Litio y CON-Salino) y sujetos que recibieron los dos sabores por separado durante el condicionamiento (grupo SEP-Litio y SEP-Salino).

Un pre-test previo evaluó la preferencia incondicionada por el sabor a limón frente a agua, dando paso a una fase de condicionamiento que constó de 4 ciclos de dos sesiones cada uno. Los sujetos de la condición conjunta (grupos CON-Litio y CON-Salino) recibieron una exposición a los dos sabores (limón y sacarosa) en la misma disolución el primer día de cada ciclo y agua en los tubos de bebida durante el segundo día. Los sujetos de la condición separada (grupos SEP-Litio y SEP-Salino) recibieron la solución de limón el primer día de cada ciclo y la solución de sacarosa al día siguiente.

La prueba de preferencia, de idénticas características al pre-test, confirmaría el desarrollo de la preferencia por el ácido cítrico y tras esta prueba, la fase de devaluación constó de 2 ciclos de 2 sesiones. Durante la primera sesión de cada ciclo,

los sujetos de la condición devaluada (grupos CON-Litio y SEP-Litio) tuvieron acceso a la solución de sacarosa durante 5 minutos y después se les proporcionó una inyección de LiCl (0.15M) a una dosis de 20 ml/kg, optando por la misma dosis de salino isotónico (0,9%) para los animales de la condición no devaluada (grupos CON-Salino y SEP-Salino) tras el consumo de la solución dulce. Durante el segundo día de cada ciclo, todos los animales tuvieron acceso libre a agua en sus jaulas a modo de recuperación.

Tras esta fase los animales fueron operados para la implantación de las cánulas. Durante el periodo de recuperación, 4 sujetos perdieron su cánula quedando los grupos conformados como sigue: Grupo CON-Litio (n= 10), Grupo SEP-Litio (n= 8), Grupo CON-Salino (n=9) y Grupo SEP-Salino (n=9). Recuperados de la intervención y tras la sesión de habituación, en la prueba de reactividad al sabor se administró a todos los sujetos una infusión de 3 ml de la solución de limón durante 3 min (tasa de infusión 1 ml/min) a primera hora de la mañana (09:00) y otra infusión de 3 ml de la solución de sacarosa durante 3 min (tasa de infusión 1 ml/min) a última hora de la mañana (13:00). Finalmente se realizó una prueba de extinción en idénticos términos que las realizadas el día del pre-test y de la prueba, prolongándose esta fase durante 3 sesiones llevadas a cabo en días sucesivos.

Tabla 10. Diseño del Experimento 5

Grupo	Pre-test	Entrenamiento x 4		Test	Devaluación x 2		Canulación	TRT	Extinción x 3
SEP-Litio		Limón	Sacarosa		Sacarosa → LiCl	Agua	Implantación de cánula en la cavidad oral	3 ml Limón IO	Agua
CON-Litio	Agua	Limón + Sacarosa	Agua	Agua				3 ml Sacarina IO	Vs
SEP-Salino	Limón	Limón	Sacarosa	Limón	Sacarosa → Salino	3 ml Sacarina IO		Limón	
CON-Salino		Limón + Sacarosa	Agua						

Nota. SEP: presentación por separado de los sabores; CON: presentación conjunta; LiCl: cloruro de litio; TRT: test de reactividad al sabor; IO: infusión intraoral.

7.2.3. Resultados

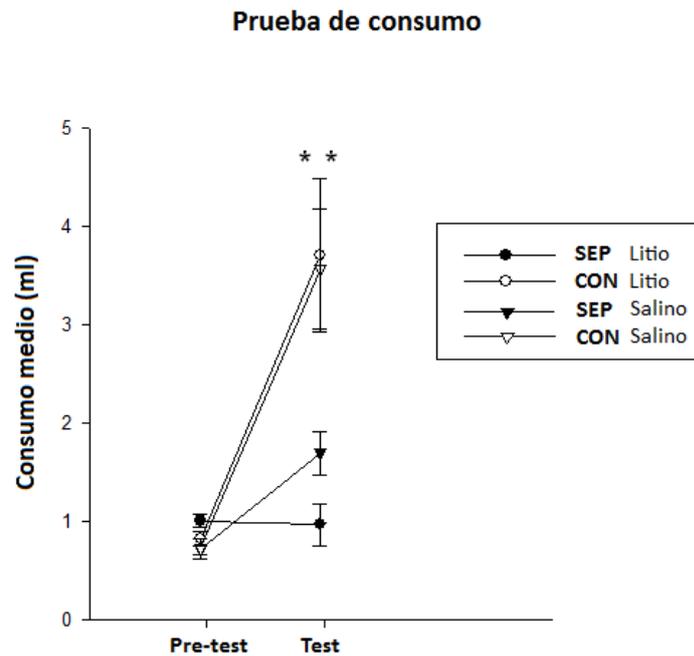
7.2.3.1 Prueba de consumo

Como se observa en la Figura 8a, todos los grupos mostraron un consumo similar de la solución de limón durante la prueba inicial de preferencia (pre-test). En la prueba realizada tras el condicionamiento, los sujetos de los grupos que habían recibido la solución de limón de forma conjunta con sacarosa (grupos CON-Litio y CON-Salino) mostraron un consumo de limón más elevado que los sujetos de los grupos de control (grupos SEP-Litio y SEP-Salino), que recibieron los dos sabores por separado. Este resultado indica que la experiencia conjunta de ambos sabores (limón + sacarosa) incentivó el desarrollo de una preferencia condicionada por el limón, tal y como observamos en el Experimento 2 (Capítulo 6). Un ANOVA de medidas repetidas con el Grupo como factor inter-sujetos y las Sesiones (pre-test y prueba) como factor intra-sujetos, mostró un efecto significativo del factor Sesiones [$F_{(1,32)} = 35,503$; $p < 0,001$], del factor Grupo y de la interacción Sesión x Grupo [$F_{(3,32)} \geq 5,202$; $ps \leq 0,005$]. El análisis de la interacción mediante pruebas ANOVA de un factor indicó una ausencia de diferencias significativas entre los grupos durante la prueba de preferencia inicial [$F_{(1,32)} = 2,243$; $p = 0,102$]; en cambio, en la prueba de preferencia realizada tras el condicionamiento sí se encontraron diferencias significativas [$F_{(3,32)} = 5,913$; $p = 0,002$]. El ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$) para las comparaciones múltiples confirmó que los sujetos de la condición conjunta (grupos CON-Litio y CON-Salino) tuvieron un consumo de limón en la prueba significativamente superior al de los sujetos que recibieron las soluciones por separado (grupos SEP-Litio y SEP-Salino).

Estos datos confirman que la experiencia conjunta del limón con la sacarosa durante el condicionamiento favoreció el desarrollo de una preferencia por la solución cítrica, observada en la prueba de consumo realizada tras el entrenamiento.

Los consumos medios de cada grupo en la prueba inicial (pre-test) y en la prueba de preferencia (test) realizada tras el condicionamiento se muestran en la Tabla 11a. Por otro lado, la Tabla 11b muestra los consumos de las diferentes soluciones durante la fase de condicionamiento.

Figura 8a. Experimento 5: Prueba de consumo



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo durante la prueba inicial de preferencia incondicionada (pre-test) y en la prueba de preferencia (test) realizada tras el condicionamiento. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos alude al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento que recibieron durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Litio) o de salino isotónico (Salino).

Tabla 11a. Experimento 5: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo

Grupo	Pre-test	Test
SEP-Litio	1,01 ($\pm 0,06$)	0,97 ($\pm 0,21$)
CON-Litio	0,83 ($\pm 0,07$)	3,70 ($\pm 0,78$)
SEP-Salino	0,72 ($\pm 0,10$)	1,70 ($\pm 0,22$)
CON-Salino	0,74 ($\pm 0,08$)	3,57 ($\pm 0,61$)

Nota. Consumo medio de la solución de limón (ml) para cada grupo durante la prueba de preferencia inicial (Pre-test) y la prueba tras el condicionamiento (Test). Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 11b. Experimento 5: Consumos registrados durante la fase de condicionamiento

Grupo	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
SEP-Litio	3,50 ($\pm 0,31$)	3,36 ($\pm 0,53$)	3,88 ($\pm 0,28$)	6,57 ($\pm 0,48$)	3,71 ($\pm 0,17$)	6,71 ($\pm 0,21$)	4,80 ($\pm 0,22$)	5,10 ($\pm 0,33$)
CON-Litio	2,80 ($\pm 0,40$)	6,02 ($\pm 0,32$)	5,16 ($\pm 0,62$)	5,76 ($\pm 0,39$)	6,57 ($\pm 0,65$)	7,41 ($\pm 0,20$)	5,91 ($\pm 0,44$)	5,69 ($\pm 0,37$)
SEP-Salino	3,00 ($\pm 0,39$)	4,06 ($\pm 0,52$)	4,26 ($\pm 0,21$)	6,96 ($\pm 0,52$)	4,90 ($\pm 0,68$)	8,05 ($\pm 0,58$)	4,11 ($\pm 0,25$)	6,08 ($\pm 0,52$)
CON-Salino	2,55 ($\pm 0,27$)	5,55 ($\pm 0,38$)	5,41 ($\pm 0,80$)	7,44 ($\pm 0,41$)	7,03 ($\pm 0,47$)	7,07 ($\pm 0,77$)	6,37 ($\pm 0,55$)	6,36 ($\pm 0,38$)

Nota. Consumo medio (ml) de la solución gustativa correspondiente a cada grupo durante la fase de condicionamiento. Los grupos CON-Litio y CON-Salino recibieron limón + sacarosa en los ensayos Tipo A y agua en los ensayos Tipo B. Los grupos SEP-Litio y SEP-Salino recibieron limón en los ensayos Tipo A y sacarosa en los ensayos Tipo B. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

7.2.3.2. Prueba de reactividad al sabor

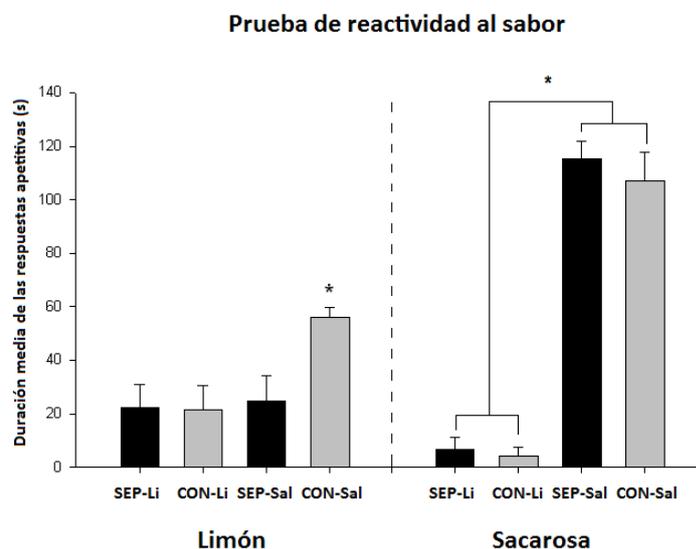
Respuestas apetitivas

En la prueba de reactividad al limón, el grupo de la condición no devaluada que recibió el limón de forma conjunta con la sacarosa durante el condicionamiento (Grupo CON-Salino) mostró una tasa de respuestas apetitivas superior al resto de grupos durante la infusión de esta solución (ver Figura 8b). Un ANOVA de dos factores (Exposición: conjunta o separada; y Devaluación: litio o salino) con los datos de esta prueba mostró un efecto significativo del factor Devaluación [$F_{(1,32)} = 5,311$; $p = 0,028$]. Los efectos del factor Exposición [$F_{(1,32)} = 3,563$; $p = 0,068$] y de la Interacción Devaluación x Exposición [$F_{(1,32)} = 3,947$; $p = 0,056$] estuvieron también muy próximos al nivel de significatividad. Un ANOVA posterior con los Grupos como factor, destacó la existencia de diferencias significativas entre los grupos [$F_{(3,35)} = 4,309$; $p = 0,012$] y la prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls indicó que estas diferencias se daban entre el grupo CON-Salino y al resto de grupos, que no diferían entre sí. Estos datos indican que la experiencia de devaluación del reforzador ahora sí modificó las reacciones apetitivas mostradas por los animales ante el sabor de limón. Además, que el grupo CON-Salino mantenga una tasa de respuestas apetitivas superior al resto de grupos después de la devaluación, indica que la experiencia conjunta de la solución de limón con la sacarosa durante el condicionamiento incrementó las cualidades hedónicas del limón, tal y como ocurría en el Experimento número 2 (Capítulo 6).

En cuanto al número de respuestas apetitivas en la prueba de reactividad a la sacarosa, los resultados mostraron una reducción en las cualidades hedónicas de esta solución cuando se llevó a cabo la devaluación con LiCl (ver Figura 8b). En este sentido,

los grupos de la condición de devaluación (Grupos CON-Litio y SEP-Litio) mostraron un número muy reducido de respuestas apetitivas en comparación con los grupos de la condición no devaluada (Grupo CON-Salino y SEP-Salino). Un ANOVA de dos factores (Exposición y Devaluación) realizado con los datos de esta prueba reveló un claro efecto del factor Devaluación [$F_{(1,32)} = 249,908$; $p < 0,001$], sin efecto alguno del factor Exposición ni de la interacción Exposición x Devaluación [$F_s < 1$]. Posteriormente, un ANOVA de un factor (Grupo) indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos [$F_{(3,35)} = 81,978$; $p < 0,001$] y la prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$) confirmó que los grupos no devaluados (CON-Salino y SEP-Salino) tuvieron una tasa de respuestas apetitivas significativamente superior a la de los grupos devaluados (CON-Litio y SEP-Litio), que tampoco difirieron entre sí.

Figura 8b. Experimento 5: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad



Nota. Duración media (en segundos) de las respuestas apetitivas realizadas por los animales de cada grupo durante la infusión de limón y de sacarosa en la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos refiere al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Li) o de salino isotónico (Sal).

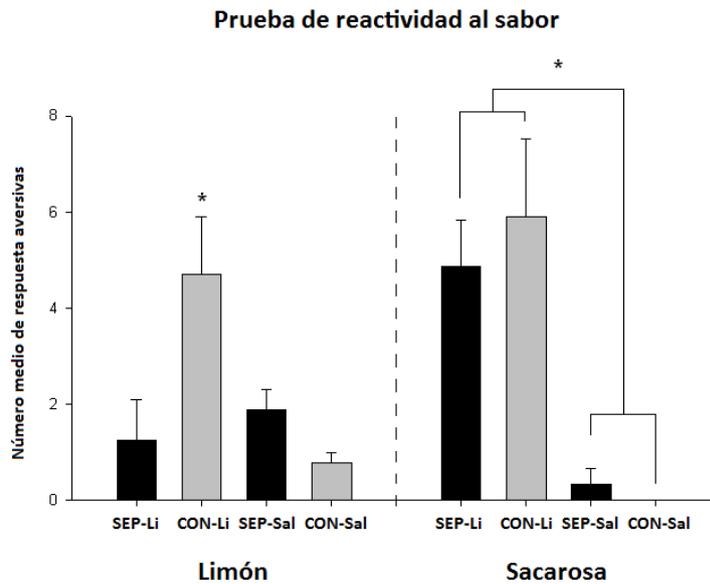
Respuestas aversivas

Con respecto al patrón de respuestas de rechazo, el grupo de la condición devaluada que recibió la solución de limón de forma conjunta con la sacarosa durante el condicionamiento (Grupo CON-Litio) mostró un mayor número de respuestas aversivas ante la infusión del ácido cítrico (ver Figura 8c). El ANOVA realizado con los factores Exposición y Devaluación mostró un efecto significativo del factor Devaluación [$F_{(1,32)} = 4,146$; $p = 0,050$] y de la interacción Exposición x Devaluación [$F_{(3,32)} \leq 8,001$; $ps \geq 0,008$]. Un ANOVA de un factor (Grupo) confirmó que las diferencias entre los grupos fueron significativas [$F_{(3,35)} = 5,086$; $p = 0,005$] y la prueba *post hoc* de Games-Howell indicó que el Grupo CON-Litio difería de forma significativa del resto de grupos.

Finalmente y como se puede observar en la parte derecha de la Figura 8c, los sujetos de la condición devaluada (Grupos CON-Litio y SEP-Litio) mostraron un número mayor de respuestas aversivas a la solución de sacarosa. El análisis de estos datos con un ANOVA de dos factores (Exposición y Devaluación) reveló un efecto significativo del factor Devaluación [$F_{(1,32)} = 26,119$; $p < 0,001$] pero no así del factor Exposición ni de la interacción [$F < 1$]. El ANOVA de un factor (Grupo) realizado posteriormente confirmó la existencia de diferencias entre los grupos en cuanto al número medio de respuestas aversivas [$F_{(3,35)} = 9,165$; $p < 0,001$]. Así pues, la comparación *post hoc* con la prueba de Games-Howell ($p < 0,05$) indicó que los grupos de la condición devaluada (CON-Litio y SEP-Litio) mostraban un número significativamente mayor de respuestas aversivas que los no devaluados (CON-Salino y SEP-Salino), demostrando que la devaluación fue efectiva para reducir las cualidades hedónicas de la sacarosa.

En la Tabla 11c se muestran los valores promedio para las dos categorías de respuestas examinadas (apetitivas y aversivas) en los diferentes grupos de sujetos.

Figura 8c. Experimento 5: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad



Nota. Número medio de respuestas aversivas realizadas por los sujetos de cada grupo durante la infusión de limón y de sacarosa en la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos refiere al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Li) o de salino isotónico (Sal).

Tabla 11c. Experimento 5: Respuestas registradas en la prueba de reactividad

Grupo	Limón		Sacarosa	
	Apetitivas	Aversivas	Apetitivas	Aversivas
SEP-Litio	22,37 (\pm 8,54)	1,25 (\pm 0,84)	6,82 (\pm 4,42)	4,98 (\pm 0,97)
CON-Litio	22,57 (\pm 8,92)	4,70 (\pm 1,20)	4,30 (\pm 3,00)	5,90 (\pm 1,62)
SEP-Salino	24,92 (\pm 9,25)	0,78 (\pm 0,22)	115,45 (\pm 6,53)	0,33 (\pm 0,32)
CON-Salino	56,00 (\pm 3,72)	2,25 (\pm 0,46)	106,95 (\pm 10,63)	0,00 (\pm 0,00)

Nota. Respuestas apetitivas (duración media en segundos) y aversivas (tasa media de respuestas) mostradas por los animales de cada grupo durante las infusiones de limón y de sacarosa en la prueba de reactividad al sabor. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos refiere al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Litio) o de salino isotónico (Salino).

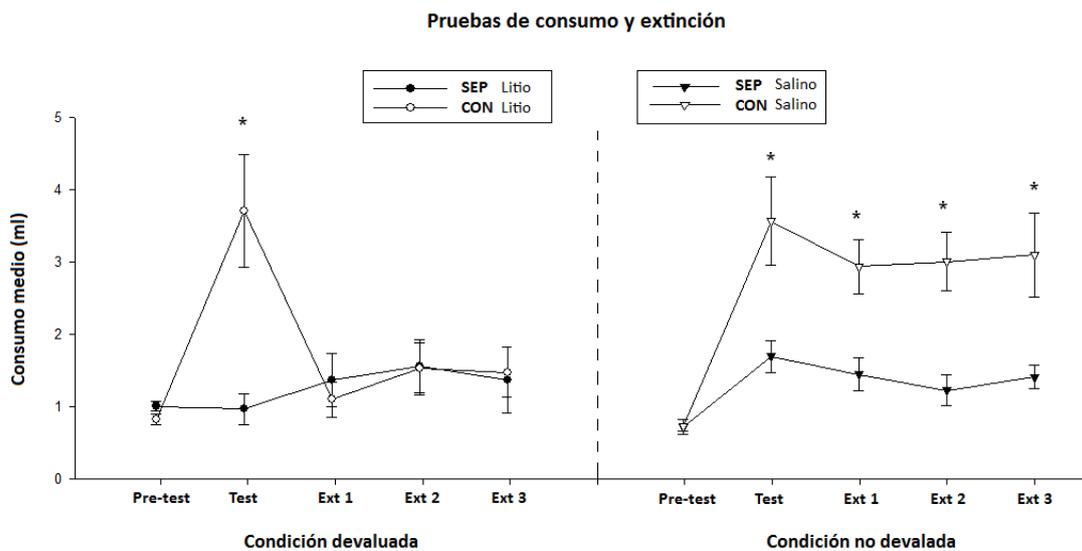
7.2.3.3. Prueba de extinción

La Figura 8d muestra los consumos de la solución cítrica en las diferentes sesiones de la prueba de extinción. Nuevamente, los datos se muestran en dos gráficos con el objetivo de simplificar la interpretación de los resultados. Los resultados indican que, tras la fase de devaluación, el grupo de la condición no devaluada y con experiencia conjunta del limón y la sacarosa durante el condicionamiento (CON-Salino) mostró un consumo superior al resto de grupos, manteniéndose en un volumen similar a la prueba. Además, tras la devaluación de la sacarosa se observa una supresión drástica en el consumo del grupo con experiencia conjunta (CON-Litio) durante la prueba de extinción. El análisis conjunto con un ANOVA de medidas repetidas y las variables Devaluación (litio o salino) y Exposición (conjunta o separada) como factores inter-sujetos, así como las Sesiones de extinción como factor intra-sujetos (incluyendo el día de la prueba) reveló un efecto significativo de los factores Exposición, y Devaluación, así como de su interacción [$F_{5(1,32)} \geq 5,202$; $ps \leq 0,029$]. El análisis también mostró un efecto significativo del factor Sesiones y de la interacción Sesiones x Exposición [$F_{3(96)} \geq 3,052$; $ps \leq 0,032$]. Esto indica que la diferencia existente en el consumo de limón a lo largo de las sesiones, provocada por el efecto de la devaluación del reforzador, depende del tipo de exposición a las soluciones durante el condicionamiento (conjunta o separada). Para evaluar entre que grupos existían las diferencias en las diferentes sesiones, un análisis de las comparaciones múltiples con el ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$) indicó, por un lado, un efecto significativo de la exposición conjunta (grupos CON-Litio y CON-Salino) respecto a la exposición separada (grupos SEP-Litio y SEP-Salino) en la prueba [$F_{(1,32)} = 17,123$; $p < 0,001$], resultado que ya se había indicado en el análisis para la prueba de consumo y, por otro lado, un

consumo de la solución de limón significativamente más elevado en el grupo de la condición no devaluada que recibió las soluciones de forma conjunta (Grupo CON-Sal) respecto al resto de grupos en las 3 sesiones de extinción [$F_{s(3,32)} \geq 4,031$; $ps \leq 0,015$]. Estos resultados indican la consistencia del aprendizaje de preferencia condicionada por el sabor a lo largo del tiempo y la influencia que ejerce el procedimiento de devaluación del reforzador sobre la misma.

Los consumos de la solución de limón para todos los grupos durante las sesiones de extinción se muestran en la Tabla 11d.

Figura 8d. Experimento 5: Pruebas de consumo y extinción



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo durante la prueba inicial (Pre-test), la prueba de preferencia (Test) y la prueba de extinción (Ext 1,2 y 3). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos alude al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido en la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Litio) o de salino isotónico (Salino).

Tabla 11d. Experimento 5: Consumos registrados durante la prueba de extinción

Grupo	Extinción 1	Extinción 2	Extinción 3
SEP-Litio	1,37 ($\pm 0,37$)	1,56 ($\pm 0,36$)	1,37 ($\pm 0,46$)
CON-Litio	1,10 ($\pm 0,24$)	1,53 ($\pm 0,36$)	1,48 ($\pm 0,35$)
SEP-Salino	1,45 ($\pm 0,23$)	1,23 ($\pm 0,21$)	1,41 ($\pm 0,16$)
CON-Salino	2,94 ($\pm 0,38$)	3,01 ($\pm 0,40$)	3,10 ($\pm 0,58$)

Nota. Consumo medio de la solución de limón (ml) para cada grupo durante las diferentes sesiones de la prueba de extinción. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

7.3. Experimento 6

Efecto de la devaluación de la maltodextrina en preferencia condicionada

En el Experimento 6 se evalúa de nuevo la asociación sabor-nutriente a través del desarrollo de una preferencia condicionada por una solución gustativa (limón) asociada con una solución nutritiva y sin sabor dulce (maltodextrina). Así mismo, interesa observar la influencia que el procedimiento de devaluación del reforzador tiene sobre la propia asociación y sobre la transferencia de las cualidades hedónicas del EI a la solución EC. En el Experimento 3 de la serie experimental anterior (Capítulo 6) se observó un aumento en el consumo de la solución de limón y un incremento de la tasa de respuestas apetitivas al ácido cítrico cuando se desarrolla una preferencia condicionada por una solución de limón utilizando maltodextrina como EI. Este resultado sugiere que las cualidades hedónicas de la solución reforzante se transfieren al sabor condicionado, relacionándose con la formación de una asociación sabor-nutriente. Mediante el procedimiento de devaluación, este experimento pretende observar si existe una disminución en la valoración hedónica adquirida por el sabor durante el condicionamiento tras la devaluación de la maltodextrina.

Con este propósito, la mitad de las ratas del experimento (grupos CON-Litio y CON-salino) recibieron la solución de limón de forma conjunta con la maltodextrina durante el condicionamiento. El resto de los animales (Grupos SEP-Litio y SEP-Salino) recibieron las soluciones de limón y de maltodextrina de forma separada en esta fase. Más tarde, en la fase de devaluación, la mitad de los sujetos de cada condición de exposición a los sabores (conjunta o separada) recibieron inyecciones de cloruro de

litio tras una nueva exposición a la solución de maltodextrina; los sujetos de control fueron inyectados con salino isotónico en la fase de devaluación.

Como hemos visto en los experimentos anteriores de esta serie, el efecto de la devaluación del reforzador debería reducir la preferencia previamente condicionada por el sabor a limón. Por otro lado, cabe esperar que la devaluación de la maltodextrina reduzca las respuestas apetitivas evocadas por el limón al tiempo que aumentan las respuestas aversivas o de rechazo de esta solución.

7.3.1. Sujetos y soluciones

Se emplearon un total de 40 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*) procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Los animales tenían al comienzo del experimento alrededor de los tres meses de edad y un peso medio de 292 gramos (rango 230-370 g). A su llegada al laboratorio, fueron alojados en las condiciones de iluminación y temperatura ambiente descritas en el apartado sobre material y método general (capítulo 5).

La solución de limón que se utilizó como estímulo gustativo (EC), al igual que en los experimentos previos, se obtuvo diluyendo ácido cítrico en agua destilada a una concentración del 3%. Como EI se utilizó una solución de maltodextrina diluida en agua destilada al 8%. Para llevar a cabo la fase de devaluación, los sujetos de la condición devaluada fueron inyectados con cloruro de litio (0.15M) a una dosis de 20 ml/kg de peso corporal, optando por la misma dosis de salino Isotónico (0,9%) para los sujetos de los grupos de control.

7.3.2. Procedimiento

Como se muestra en la Tabla 12, este experimento se llevó a cabo siguiendo un procedimiento idéntico a los dos anteriores, destacando las siguientes fases:

En primer lugar y tras la fase previa de privación de agua, los animales fueron asignados a dos grupos en base a su consumo. Los diferentes grupos se conformaron según el tratamiento que recibirían durante la fase de condicionamiento: sujetos a los que se les proporcionaban las diferentes soluciones de forma conjunta (Grupos CON-Litio y CON-Salino) y sujetos que recibían los dos sabores por separado en días alternos (grupos SEP-Litio y SEP-Salino).

Una prueba de consumo (Pre-test) de 5 minutos para determinar la preferencia inicial por el limón frente a agua precedió a la fase de condicionamiento en la cual, durante 4 ciclos de dos sesiones, los sujetos de la condición conjunta (grupos CON-Litio y Con-Salino) recibían una exposición a los dos sabores (limón y maltodextrina) en la misma disolución el primer día de cada ciclo y una exposición a agua el segundo día. Los sujetos de la condición separada (grupos SEP-Litio y SEP-Salino) recibían el primer día la solución de limón y el segundo día la solución de maltodextrina.

La prueba de consumo de limón frente a agua confirmaría si el entrenamiento había sido suficiente para provocar un cambio en la preferencia por el limón.

Tras esta prueba, la fase de devaluación siguió el mismo esquema que en los experimentos anteriores y durante 2 ciclos de dos sesiones cada uno, los sujetos de la condición devaluada (grupos CON-Litio y SEP-Litio) tuvieron acceso a la solución de maltodextrina durante 5 minutos y después se les inyectó con cloruro de litio (0.15M) a una dosis de 20 ml/kg el primer día de cada ciclo. En esa misma sesión los sujetos de la condición no devaluada (grupos SEP-Salino y CON-Salino) fueron inyectados con

vehículo salino isotónico (0,9%) tras el consumo de la solución nutritiva. En el segundo día de cada ciclo, todos los animales tuvieron acceso libre a agua para recuperarse de los efectos de las inyecciones.

Posteriormente, los animales fueron operados para el implante de las cánulas intraorales de cara a la prueba de reactividad. Durante el periodo de recuperación 1 de los sujetos perdió su cánula y fue apartado del experimento, quedando los grupos conformados de la siguiente forma: Grupo CON-Litio (n=10), Grupo SEP-Litio (n=10), Grupos CON-Salino (n=10) y Grupo SEP-Salino (n=9).

Tras la recuperación y la sesión de habituación al aparato de infusión, en la prueba de reactividad al sabor se administró a todos los sujetos una infusión de 3 ml de la solución de limón durante 3 minutos (tasa de infusión 1 ml/min) a primera hora de la mañana (09:00) y otra infusión de 3 ml de la solución de maltodextrina durante 3 minutos (tasa de infusión 1 ml/min) a última hora de la mañana (13:00).

Para finalizar el experimento, se llevó a cabo la prueba de extinción a partir del siguiente día, con 3 sesiones idénticas al Pret-test y a la Prueba.

Tabla 12. Diseño del Experimento 6

Grupo	Pre-test	Entrenamiento x 4		Test	Devaluación x 2		Canulación	TRT	Extinción x 3
SEP-Litio		Limón	Maltodextrina		Maltodextrina → LiCl	Agua	Implantación de cánula en la cavidad oral	3 ml Limón IO	Agua
CON-Litio	Agua	Limón + Maltodextrina	Agua	Agua				3 ml IO	Vs
SEP-Salino	Limón	Limón	Maltodextrina	Limón	Maltodextrina → Salino			3 ml Sacarina IO	Limón
CON-Salino		Limón + Maltodextrina	Agua						

Nota. SEP: presentación por separado de los sabores; CON: presentación conjunta; LiCl: cloruro de litio; TRT: test de reactividad al sabor; IO: infusión intraoral.

7.3.3. Resultados

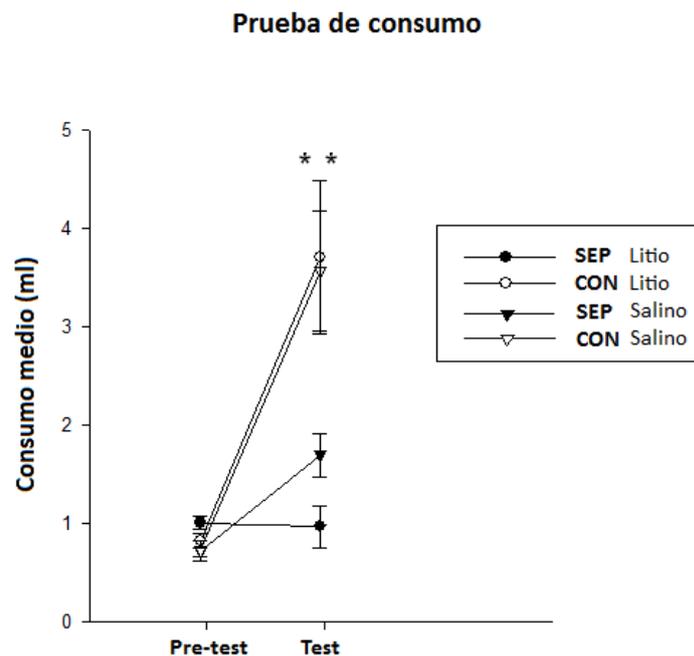
7.3.3.1. Prueba de consumo

Durante la prueba inicial de preferencia (Pre-test) todos los grupos de sujetos mostraron un consumo similar de la solución de limón (ver Figura 9a). Sin embargo, durante la prueba realizada tras el condicionamiento, los sujetos que habían recibido la presentación conjunta de las soluciones de limón y maltodextrina (grupos CON-Litio y CON-Salino) mostraron un consumo de limón más elevado que los grupos que recibieron los dos sabores por separado (grupos SEP-Litio y SEP-Salino). Este patrón de consumo indica que la experiencia conjunta de las soluciones (limón + maltodextrina) fomentó el desarrollo de una preferencia condicionada por el limón. Este resultado es congruente con el obtenido en el Experimento 3 de la primera serie (Capítulo 6). El análisis estadístico de los datos, mediante un ANOVA de medidas repetidas con el Grupo como factor inter-sujetos y las Sesiones (pre-test y prueba) como factor intra-sujetos, indicó un efecto significativo del factor Sesiones [$F_{(1,35)} = 46,901$; $p < 0,001$] y también un efecto significativo del factor Grupo y de la interacción Sesión x Grupo [$F_{(3,35)} \geq 3,601$; $ps \leq 0,023$]. El análisis de la interacción mediante pruebas ANOVA de un factor (Grupo) indicó una ausencia de diferencias significativas entre los grupos durante la prueba de preferencia inicial [$F < 1$]; sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la prueba de preferencia realizada tras el condicionamiento [$F_{(3,35)} = 4,224$; $p = 0,012$]. El ajuste para las comparaciones múltiples de Bonferroni ($p < 0,05$) confirmó que los sujetos con exposición conjunta a los sabores (grupos CON-Litio y CON-Salino) consumieron una cantidad significativamente mayor de limón que los sujetos con exposición separada (grupos SEP-Litio y SEP-Salino).

Estos datos confirman el desarrollo de una preferencia por la solución cítrica cuando los sujetos experimentan de forma conjunta las soluciones de limón y de maltodextrina en la fase de condicionamiento.

La Tabla 13a muestra los consumos medios (\pm SEM) de cada grupo en la prueba inicial (Pre-test) y en la prueba de preferencia (Test). Así mismo, en la Tabla 13b se observan los consumos de las diferentes soluciones durante la fase de condicionamiento.

Figura 9a. Experimento 6: Prueba de consumo



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo durante la prueba inicial de preferencia incondicionada (Pre-test) y en la prueba de preferencia (Test) realizada tras el condicionamiento. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos alude al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento que recibieron durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Litio) o de salino isotónico (Salino).

Tabla 13a. Experimento 6: Ingesta de la solución de limón en las pruebas de consumo

Grupo	Pre-test	Test
SEP-Litio	0,91 ($\pm 0,16$)	1,54 ($\pm 0,38$)
CON-Litio	0,75 ($\pm 0,09$)	3,68 ($\pm 0,72$)
SEP-Salino	0,83 ($\pm 0,12$)	1,96 ($\pm 0,66$)
CON-Salino	0,90 ($\pm 0,21$)	3,76 ($\pm 0,43$)

Nota. Consumo medio de la solución de limón (ml) para cada grupo durante la prueba de preferencia inicial y la prueba tras el condicionamiento. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 13b. Experimento 6: Consumos registrados durante la fase de condicionamiento

Grupo	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
SEP-Litio	2,47 ($\pm 0,25$)	3,49 ($\pm 0,19$)	4,54 ($\pm 0,46$)	5,71 ($\pm 0,40$)	4,03 ($\pm 0,42$)	6,22 ($\pm 0,43$)	5,43 ($\pm 0,36$)	6,32 ($\pm 0,37$)
CON-Litio	1,92 ($\pm 0,21$)	6,36 ($\pm 0,19$)	5,64 ($\pm 0,58$)	6,17 ($\pm 0,19$)	5,98 ($\pm 0,36$)	6,77 ($\pm 0,28$)	6,84 ($\pm 0,46$)	6,67 ($\pm 0,36$)
SEP-Salino	2,60 ($\pm 0,17$)	3,86 ($\pm 0,27$)	4,08 ($\pm 0,50$)	5,48 ($\pm 0,36$)	4,32 ($\pm 0,50$)	6,05 ($\pm 0,38$)	4,37 ($\pm 0,56$)	6,00 ($\pm 0,46$)
CON-Salino	2,26 ($\pm 0,37$)	5,40 ($\pm 0,35$)	5,00 ($\pm 0,71$)	6,49 ($\pm 0,34$)	6,32 ($\pm 0,30$)	6,83 ($\pm 0,44$)	6,01 ($\pm 0,43$)	7,30 ($\pm 0,41$)

Nota. Consumo medio (ml) de la solución gustativa correspondiente a cada grupo durante la fase de condicionamiento. Los grupos CON-Litio y CON-Salino recibieron limón + maltodextrina en los ensayos Tipo A y agua en los ensayos Tipo B. Los grupos SEP-Litio y SEP-Salino recibieron limón en los ensayos Tipo A y maltodextrina en los ensayos Tipo B. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

7.3.3.2. Prueba de reactividad al sabor

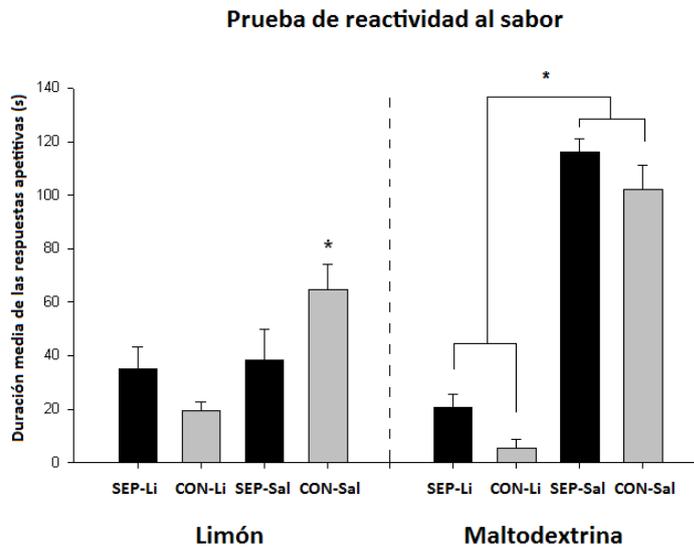
Respuestas apetitivas

Fijándonos en el patrón de respuestas apetitivas mostradas por los animales ante la infusión de limón en la prueba de reactividad (ver Figura 9b), el grupo de la condición no devaluada y con exposición conjunta (Grupo CON-Salino) mostró una tasa de respuestas apetitivas superior al resto de grupos. Un ANOVA con los factores Exposición (conjunta o separada) y Devaluación (con litio o salino) realizado con los datos de esta prueba mostró un efecto del factor Devaluación [$F_{(1,35)} = 8,181$; $p = 0,007$] y de la interacción Devaluación x Exposición [$F_{(1,35)} = 6,079$; $p = 0,019$]. El análisis de la interacción mediante un ANOVA con la variable Grupo como factor, destacó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos [$F_{(3,38)} = 4,309$; $p = 0,012$]. La prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls confirmó que las diferencias fueron significativas entre el grupo CON-Salino y el resto de grupos, que no diferían entre sí. Estos datos indican que la experiencia conjunta de las soluciones de limón y maltodextrina provocó un aumento en la tasa de reacciones apetitivas ante la infusión de limón, tal y como ocurría en el Experimento 3 (Capítulo 6). En este sentido, el procedimiento de devaluación de la maltodextrina se vio reflejado en un decremento de las reacciones apetitivas mostradas por los animales ante el sabor condicionado.

En cuanto al número de respuestas apetitivas en la prueba de reactividad a la maltodextrina, se observa un patrón similar a los experimentos previos de esta serie (ver Figura 9b); esto es, los grupos en los que se llevó a cabo la devaluación de la maltodextrina mediante inyecciones de LiCl (grupos CON-Litio y SEP-Litio) mostraron un número de respuestas apetitivas a esta solución mucho más bajo en comparación

con los grupos de la condición no devaluada (grupos CON-Salino y SEP-Salino). Un ANOVA de dos factores (Exposición y Devaluación) realizado con los datos de esta prueba reveló un claro efecto del factor Devaluación [$F_{(1,35)} = 289,706$; $p < 0,001$], pero no del factor Exposición ni de la interacción [$F_s < 1$]. Posteriormente, un ANOVA de un factor (Grupo) indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos [$F_{(3,38)} = 98,219$; $p < 0,001$] y la prueba *post hoc* de Games-Howell ($p < 0,05$) confirmó que los grupos no devaluados (CON-Salino y SEP-Salino) diferían de forma significativa de los grupos devaluados (CON-Litio y SEP-Litio) en cuanto a su tasa de respuestas apetitivas.

Figura 9b. Experimento 6: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad



Nota. Duración media (en segundos) de las respuestas apetitivas realizadas por los animales de cada grupo durante la infusión de limón y de maltodextrina en la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos refiere al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Li) o de salino isotónico (Sal).

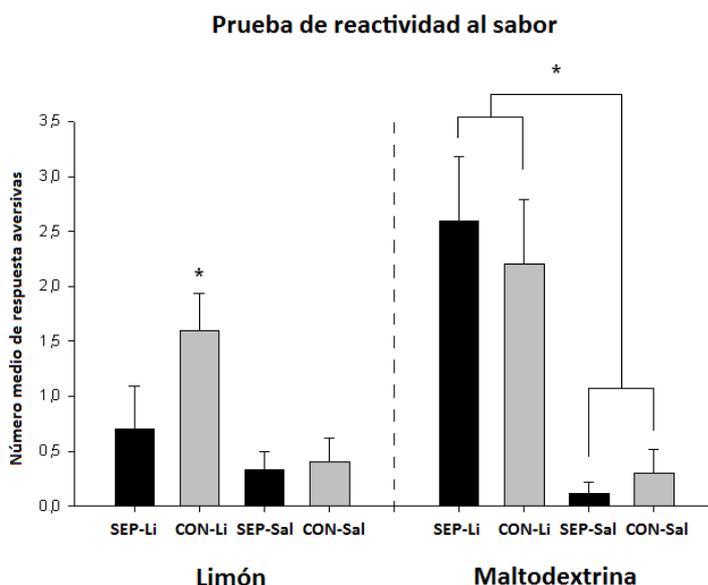
Respuestas aversivas

Por otro lado y en relación al patrón de respuestas aversivas mostrado por los animales en la prueba de reactividad, en la Figura 9c se observa un mayor número de respuestas aversivas ante la infusión del ácido cítrico en el grupo de la condición devaluada que recibió las soluciones de forma conjunta durante el condicionamiento (Grupo CON-Litio). Un ANOVA realizado con los factores Exposición y Devaluación tan solo mostró un efecto significativo del factor Devaluación [$F_{(1,35)} = 6,762$; $p = 0,014$]. Un ANOVA de un factor (Grupo) confirmó que las diferencias entre los grupos fueron significativas [$F_{(3,38)} = 3,784$; $p = 0,019$] y la prueba *post hoc* de Games-Howell indicó que el Grupo CON-Litio difería de forma significativa del resto de grupos.

Por último, los sujetos de la condición devaluada (grupos CON-Litio y SEP-Litio) mostraron un número mayor de respuestas aversivas o de rechazo cuando la solución infundida fue la maltodextrina (ver Figura 9c). El análisis estadístico realizado con un ANOVA de dos factores (Exposición y Devaluación) reveló un efecto significativo del factor Devaluación [$F_{(1,35)} = 24,480$; $p < 0,001$], pero no así del tipo de Exposición o de la interacción [$F < 1$]. Un ANOVA de un factor (Grupo) realizado posteriormente confirmó la existencia de diferencias significativas en cuanto al número medio de respuestas aversivas entre los grupos [$F_{(3,38)} = 8,303$; $p < 0,001$]. Una prueba *post hoc* de Games-Howell ($p < 0,05$) confirmó que los grupos de la condición devaluada (CON-Litio y SEP-Litio) mostraban un número significativamente mayor de respuestas aversivas que los grupos de la condición no devaluada (CON-Salino y SEP-Salino).

En la Tabla 13c se muestran los valores promedio para las diferentes categorías de respuestas (apetitivas y aversivas) evaluadas en los diferentes grupos de sujetos.

Figura 9c. Experimento 6: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad al sabor



Nota. Número medio de respuestas aversivas realizadas por los sujetos de cada grupo durante la infusión de limón y de maltodextrina en la prueba de reactividad al sabor. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos refiere al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Li) o de salino isotónico (Sal).

Tabla 13c. Experimento 6: Respuestas registradas en la prueba de reactividad

Grupo	Limón		Maltodextrina	
	Apetitivas	Aversivas	Apetitivas	Aversivas
SEP-Litio	35,01 (\pm 8,20)	0,70 (\pm 0,39)	20,80 (\pm 4,93)	2,60 (\pm 0,58)
CON-Litio	19,25 (\pm 3,35)	1,60 (\pm 0,34)	5,50 (\pm 1,78)	2,20 (\pm 0,59)
SEP-Salino	38,38 (\pm 11,44)	0,33 (\pm 0,16)	116,32 (\pm 4,56)	0,11 (\pm 0,11)
CON-Salino	64,68 (\pm 9,59)	0,40 (\pm 0,21)	102,31 (\pm 8,74)	1,33 (\pm 0,27)

Nota. Respuestas apetitivas (duración media en segundos) y aversivas (tasa media de respuestas) mostradas por los animales de cada grupo durante las infusiones de limón y de maltodextrina en la prueba de reactividad al sabor. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos refiere al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido durante la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Litio) o de salino isotónico (Salino).

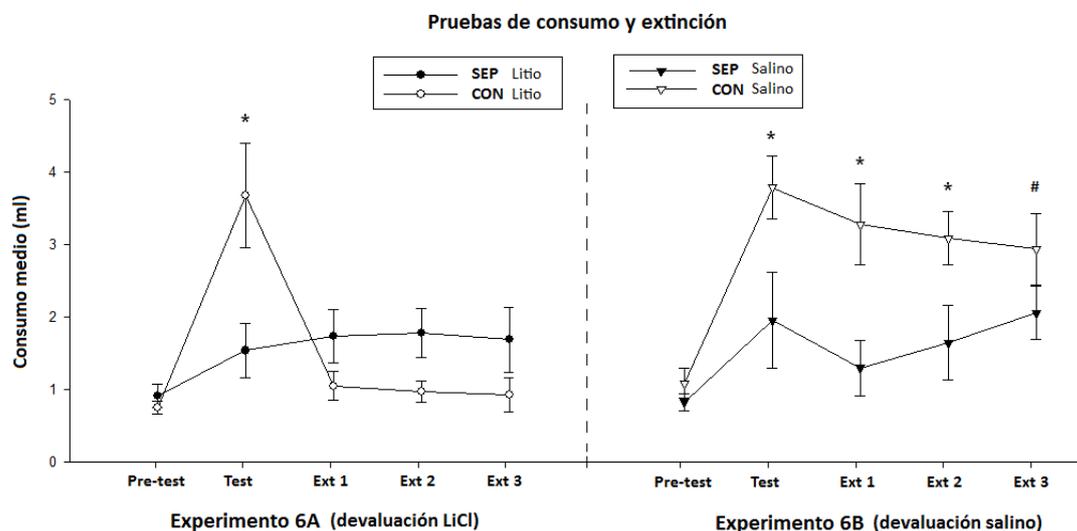
7.3.3.3. Prueba de extinción

Como en los experimentos anteriores de esta serie, los datos de los consumos de la solución cítrica en este apartado se muestran en función de la condición de devaluación para simplificar la interpretación de los resultados. Como se aprecia en la Figura 9d, el grupo de la condición no devaluada que recibió ambas soluciones de forma conjunta (Grupo CON-Salino) mostró un mayor consumo de la solución cítrica que el resto de grupos durante la prueba de extinción. Además, el consumo de la solución cítrica tras la devaluación de la maltodextrina en los sujetos del grupo con experiencia conjunta (Grupo CON-Litio) desciende incluso por debajo de los grupos que recibieron la presentación de las soluciones de forma separada. El análisis conjunto con un ANOVA de medidas repetidas donde las variables Devaluación (con litio o salino) y Exposición (conjunta o separada) fueron los factores inter-sujetos y las Sesiones de extinción (incluyendo el día de prueba) el factor intra-sujetos indicó un efecto significativo de los factores Exposición, Devaluación y de su interacción [$F_{5(1,35)} \geq 8,413$; $ps \leq 0,006$] y también un efecto significativo del factor Sesiones y de la interacción Sesiones x Exposición [$F_{3(3,105)} \geq 4,307$; $ps \leq 0,007$]. Esto indica, como en el experimento anterior, que la diferencia existente a largo de las sesiones en cuanto al consumo de limón debido al efecto de la devaluación de la maltodextrina, esta mediada por el tipo de exposición (conjunta o separada) a la que se vieron sometidos los sujetos durante la fase de entrenamiento. Las diferencias existentes entre los grupos en las diferentes sesiones se evaluaron con un análisis de las comparaciones múltiples en base el ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$). Estas comparaciones, además de revelar una diferencia significativa entre los grupos con experiencia conjunta (grupos CON-Litio y CON-Salino) y los grupos con experiencia separada (grupos SEP-Litio y SEP-

Salino) en la prueba [$F_{(1,35)} = 12,221$; $p = 0,001$], indicaron también un consumo por parte del grupo no devaluado y con experiencia conjunta (Grupo CON-Sal) significativamente mayor que el respecto al resto de grupos durante las 2 primeras sesiones de la prueba de extinción [$F_{(3,32)} \geq 6,196$; $ps \leq 0,006$] y significativamente mayor respecto al grupo devaluado y con experiencia conjunta (Grupo CON-Litio) en la tercera sesión de extinción [$F_{(3,35)} = 4,408$; $p = 0,010$], ya que su consumo se redujo drásticamente tras la devaluación de la maltodextrina. Estos resultados corroboran la robustez del aprendizaje de preferencia condicionada por el sabor y la influencia que ejerce el procedimiento de devaluación del reforzador.

Los consumos de la solución de limón para todos los grupos durante las sesiones de extinción se muestran en la Tabla 13d.

Figura 9d. Experimento 6: Pruebas de consumo y extinción



Nota. Consumo medio (ml) de la solución de limón para cada grupo durante la prueba inicial (Pre-test), la prueba de preferencia (Test) y la prueba de extinción (Ext 1, 2 y 3). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM). La denominación de los grupos alude al tipo de exposición a los sabores, conjunta (CON) o por separado (SEP) y al tratamiento recibido en la fase de devaluación, inyecciones de cloruro de litio (Litio) o de salino isotónico (Salino).

Tabla 13d. Experimento 6: Consumos registrados en la prueba de extinción

Grupo	Extinción 1	Extinción 2	Extinción 3
SEP-Litio	1,74 ($\pm 0,37$)	1,78 ($\pm 0,34$)	1,69 ($\pm 0,45$)
CON-Litio	1,05 ($\pm 0,20$)	0,97 ($\pm 0,15$)	0,93 ($\pm 0,23$)
SEP-Salino	1,30 ($\pm 0,38$)	1,65 ($\pm 0,51$)	2,06 ($\pm 0,37$)
CON-Salino	3,28 ($\pm 0,56$)	3,09 ($\pm 0,37$)	2,94 ($\pm 0,49$)

Nota. Consumo medio de la solución de limón (ml) para cada grupo durante las diferentes sesiones de la prueba de extinción. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

7.4. Discusión de la serie experimental

Los resultados obtenidos en el primer experimento de esta serie (Experimento 4) indican que la experiencia conjunta del limón con la solución de sacarina fue eficaz para promover una fuerte preferencia condicionada por el sabor a limón, como muestra el incremento en el consumo de esta solución producido tras el condicionamiento en los sujetos que tuvieron la experiencia conjunta con ambas soluciones (grupos CON-Litio y CON-Salino). Estos resultados confirman los obtenidos en la primera serie experimental de la tesis doctoral. Por otro lado, la devaluación de la solución reforzante (sacarina) tras el condicionamiento modificó la preferencia por el limón previamente establecida; esto es, la preferencia adquirida por el limón se redujo tras la fase de devaluación solamente en aquellos animales que recibieron durante el condicionamiento la solución de sacarina conjuntamente con el limón (Grupo CON-Litio). La prueba de reactividad al sabor mostró, al igual que en el Experimento 1 (ver Capítulo 6), que la preferencia condicionada por el limón en términos de consumo no se vio acompañada de un aumento en el número de respuestas apetitivas producidas durante la infusión de ese sabor. Este resultado sugiere que la preferencia gustativa formada sobre la base de una asociación sabor-sabor (es decir, entre el sabor a limón y las propiedades sensoriales o gustativas de la sacarina) no conlleva un cambio de las propiedades hedónicas de la solución gustativa (limón) asociada con la solución de sacarina. De ser así, el grupo de la condición no devaluada y que recibió el limón de forma conjunta con la sacarina durante el condicionamiento (Grupo CON-Salino) debería haber mostrado un incremento en el número de reacciones apetitivas durante la infusión de limón en relación con los restantes grupos. Además, el hecho de que los grupos en los que la sacarina fue devaluada tras el condicionamiento (grupos CON-Litio

y SEP-Litio) mostrasen un número más elevado de reacciones aversivas (y menos respuestas apetitivas) durante la prueba de reactividad con este sabor, en comparación con los sujetos de control (grupos CON-Salino y SEP-Salino), permite descartar la posibilidad de que el resultado obtenido pueda deberse a que la devaluación de la sacarina no fuese eficaz para reducir su valor reforzante. Que la devaluación fue efectiva lo prueba también el aumento en la tasa de respuestas aversivas a la solución cítrica en el grupo que recibió esta solución mezclada con la sacarina antes de la devaluación del reforzador (Grupo CON-Litio). Finalmente, la prueba de extinción confirmó las conclusiones extraídas con la prueba de reactividad al sabor al observarse que, en la condición no devaluada, la preferencia por la solución de ácido cítrico desarrollada durante el condicionamiento se mantuvo en el curso de la extinción, a diferencia de la condición devaluada donde se produjo un descenso en la preferencia condicionada por el limón durante las exposiciones no reforzadas a esta substancia.

Los resultados del Experimento 5 indican que la experiencia conjunta del limón con la solución de sacarosa produjo una fuerte preferencia condicionada por el sabor del limón, tal y como demuestra el incremento en el consumo de la solución de limón en la prueba por parte de los grupos con exposición conjunta (CON-Litio y CON-Salino). Además, el efecto de la devaluación del estímulo incondicionado (sacarosa) influyó de forma decisiva en la preferencia obtenida por la solución de ácido cítrico, en términos de consumo y modificando sus cualidades hedónicas. La prueba de reactividad mostró que este incremento en la preferencia condicionada por el limón ahora sí se vio acompañado de un aumento en el número de respuestas apetitivas producidas ante la infusión de esta solución, confirmando que la preferencia gustativa desarrollada sobre

la base del componente nutritivo está estrechamente relacionada con la transferencia de las propiedades hedónicas del EI (sacarosa, en este caso) a la solución EC (ácido cítrico). Esto se observa a través del grupo con exposición conjunta a ambos sabores y perteneciente a la condición no devaluada (Grupo CON-Salino), que muestra un número significativamente mayor de reacciones apetitivas al limón respecto al resto de grupos. Por su parte, el grupo de la condición devaluada y con experiencia conjunta (Grupo CON-Litio) vio reducida su tasa de respuestas apetitivas a la solución cítrica debido a su asociación previa con el EI devaluado. Además, el hecho de que los grupos en los que la sacarosa fue devaluada (grupos CON-Litio y SEP-Litio) mostrasen un número más elevado de respuestas aversivas (y menos apetitivas) ante la infusión de esta solución, demuestra que la devaluación de la sacarosa fue efectiva. En la misma línea, el grupo con devaluación y exposición conjunta (Grupo CON-Litio) mostró un mayor número de respuestas aversivas a la solución cítrica. Por otro lado, la prueba de extinción confirmó los resultados de la prueba de reactividad al observar un consumo de la solución cítrica equiparable a la prueba en el grupo con exposición conjunta y no devaluado (Grupo CON-Salino). Sin embargo, en el grupo devaluado y con experiencia conjunta (Grupo CON-Litio) se observó un descenso en la preferencia condicionada por el limón hasta unos niveles semejantes a los grupos de control durante las exposiciones no reforzadas a esta sustancia. Estos resultados corroboran que la transferencia del valor hedónico del EI al EC está mediada por el componente nutritivo ya que la prueba de reactividad, tras la devaluación del reforzador, refleja un cambio hedónico cuando la preferencia condicionada se desarrolló en base a un EI nutritivo, pero no cuando la asociación se produjo aludiendo al componente sensorial del EI (Experimento 4 con sacarina), como se planteó en el capítulo anterior (Capítulo 6).

Finalmente, los resultados del Experimento 6 confirman que, aunque no exista un componente sensorial significativo (sabor dulce) en el EI, la experiencia conjunta del limón con la solución de maltodextrina durante el condicionamiento produjo una fuerte preferencia condicionada por el sabor del limón. Esto se reflejó en la prueba de preferencia con un incremento en el consumo de la solución cítrica por parte de los grupos que experimentaron las soluciones de limón y maltodextrina de conjuntamente (grupos CON-Litio y CON-Salino). Por otro lado, el efecto de la devaluación del estímulo incondicionado (maltodextrina) redujo de forma drástica la preferencia obtenida por la solución cítrica, como se observa en el grupo que experimentó de forma conjunta el limón con el reforzador devaluado (Grupo CON-Litio). Además, este efecto se observó también en términos de reacciones orofaciales. En este sentido, la prueba de reactividad al limón mostró un incremento en el número de respuestas apetitivas en el grupo de la condición no devaluada y con experiencia conjunta (Grupo CON-Salino) respecto al resto de grupos. Ya que la maltodextrina carece del sabor dulce característico de los estímulos incondicionados utilizados en los experimentos previos (sacarina y sacarosa), su asociación con el limón durante el condicionamiento respondería al mecanismo de aprendizaje sabor-nutriente. Esto confirma la idea de que la preferencia gustativa desarrollada cuando existe el componente nutritivo involucrado está directamente relacionada con la transferencia de las propiedades hedónicas del EI (maltodextrina) al EC (solución cítrica) y que, además, se expresa de igual manera tras la devaluación del EI. Por otro lado, la efectividad de este efecto se demuestra también observando los grupos en los que la maltodextrina fue devaluada (Grupos CON-Litio y SEP-Litio), que mostraron un número significativamente mayor de respuestas aversivas a esta solución nutritiva en la prueba de reactividad respecto a los

grupos no devaluados (grupos CON-Salino y SEP-Salino), así como un número significativamente menor de respuestas apetitivas. En la misma línea, la existencia de un mayor número de respuestas aversivas a la solución cítrica en el grupo con exposición conjunta y devaluación (Grupo CON-Litio) corrobora los datos anteriores poniendo de manifiesto una transferencia hacia el limón de las propiedades aversivas adquiridas por la maltodextrina tras las inyecciones de litio, en base a su asociación previa durante el condicionamiento. Finalmente, la prueba de extinción confirmó los resultados de la prueba de reactividad. Durante esta prueba, el grupo con experiencia conjunta y devaluación de la maltodextrina (Grupo CON-Litio) mostró un descenso en la preferencia condicionada por el limón, ya en la primera sesión de extinción y hasta unos niveles incluso inferiores a los grupos con experiencia separada. Sin embargo, la preferencia por la solución de limón obtenida durante el condicionamiento en el grupo con experiencia conjunta y sin devaluación (Grupo CON-Salino) fue extinguiéndose paulatinamente durante las exposiciones no reforzadas a la solución cítrica. Finalmente, la utilización de un EI como la maltodextrina, que posee cualidades nutritivas pero carece de un componente sensorial gustativo importante (como el sabor dulce), puede hacer que la consistencia del aprendizaje de preferencia condicionada por el limón a lo largo del tiempo sea menor en términos de consumo. Este efecto lo encontramos también en el experimento 3 de la primera serie experimental (capítulo 6), donde se observaba una ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto al consumo de la solución cítrica en la tercera sesión de extinción.

En conjunto, los datos de esta serie experimental confirman los obtenidos en la serie anterior al probar que la experiencia conjunta del sabor a limón con una solución dulce y/o nutritiva durante el condicionamiento (sacarina, sacarosa o maltodextrina), fomenta el desarrollo de una fuerte preferencia condicionada por el sabor a limón respecto a los grupos que recibieron las soluciones de forma separada. También confirman que el cambio en la valoración hedónica del fluido tras el condicionamiento de la preferencia se establece como consecuencia de la asociación del sabor con las cualidades nutritivas del reforzador empleado durante el condicionamiento de la preferencia gustativa. Por último, el uso de la técnica de devaluación en estos experimentos puso de relieve que la reducción de las propiedades hedónicas del reforzador tras el condicionamiento reduce la preferencia previamente establecida por el sabor condicionado y también la valoración hedónica que adquirió durante el aprendizaje cuando media el componente nutritivo. Estos datos ponen de manifiesto la eficacia de la técnica de reactividad al sabor como herramienta para la evaluación del valor hedónico de las soluciones, destacando que los cambios hedónicos producidos durante la adquisición de una preferencia gustativa están más relacionados con un mecanismo de aprendizaje sabor-nutriente que con la formación de una asociación sabor-sabor.

Capítulo 8

**Valor hedónico del sabor y desarrollo
de la preferencia condicionada**

Una vez evaluados en los capítulos anteriores los cambios producidos en la respuesta hedónica a los sabores durante el aprendizaje de una preferencia gustativa y su naturaleza asociativa, en los estudios que constituyen este capítulo 7 se examina la influencia que puede tener sobre la adquisición de la preferencia el valor hedónico inicial o incondicionado de la solución gustativa. En los experimentos incluidos en los capítulos anteriores se empleó como sabor a condicionar una solución de ácido cítrico, solución que resulta moderadamente aversiva para los sujetos sin experiencia previa. En la serie de experimentos que sigue se emplearon soluciones neutras desde el punto de vista de su palatabilidad inicial, concretamente saborizantes no edulcorados. Se trata de concentrados de sustancias naturales (vegetales) o elaborados químicamente que contienen principios sávido-aromáticos y que se utilizan en el ámbito comercial para potenciar el sabor de los alimentos o darle un sabor o aroma determinado (vainilla, fresa, etc). En nuestro caso, se emplearon dos saborizantes comerciales, sabor a uva y cereza, que diluidos al 0.05% en agua resultan igualmente preferidos por los roedores. El empleo de sustancias con idéntica preferencia incondicionada permite el uso de la metodología del diseño intrasujeto evitando de este modo los problemas derivados de las preferencias innatas por ciertos sabores. Además, estos saborizantes se han empleado frecuentemente en la literatura sobre el condicionamiento de preferencias gustativas (Dwyer 2005; Fedorchak y Bolles, 1987; Pérez, Lucas y Sclafani; 1998; Sclafani y Ackroff, 2015), por lo que se presentan como una buena opción para evaluar el impacto que el valor hedónico inicial del estímulo condicionado tiene sobre las bases asociativas que subyacen a esta variedad de aprendizaje.

Como estímulos incondicionados se mantienen, dada su efectividad en las series anteriores, las soluciones de sacarina, sacarosa y maltodextrina. En este sentido, si el valor hedónico inicial de la solución condicionada influye en alguna medida sobre las diferentes asociaciones que se pueden establecer durante el aprendizaje, en las pruebas de consumo no debería afectar significativamente, pues las soluciones utilizadas como EI (sacarina, sacarosa y maltodextrina) deberían tener el potencial suficiente para generar una preferencia condicionada significativa por los sabores en cuestión (uva o cereza). Sin embargo, cabe la posibilidad de que la prueba de reactividad no sea lo suficientemente sensible como para evaluar estos cambios, ya que el sabor alternativo (EC-) con el que se contrasta el sabor condicionado (EC+) en esta prueba es también apetitivo, pudiendo producirse un efecto “techo” en cuanto al patrón de respuestas apetitivas. Este aspecto se evalúa en los primeros tres experimentos de esta serie donde se emplean los sabores a uva y cereza como estímulos condicionados, proporcionándolos de forma conjunta con los diferentes reforzadores propuestos para el desarrollo de la preferencia condicionada: sacarina (Experimento 7), sacarosa (Experimento 8) y maltodextrina (Experimento 9).

Finalmente y dada la efectividad de la prueba de reactividad al sabor para observar los cambios hedónicos que se producen durante el condicionamiento, se realizó un último experimento utilizando sacarosa como EI para el desarrollo de una preferencia por el sabor (uva o cereza). Luego se examinó cómo afecta a la preferencia gustativa previamente establecida la devaluación con cloruro de litio del componente sensorial del reforzador (a través de la devaluación de la sacarina), del componente nutritivo (mediante la devaluación de maltodextrina) o ambos aspectos (devaluando la sacarosa).

8.1. Experimento 7

Preferencia condicionada por sabores apetitivos y sacarina como EI

Este experimento tuvo por objetivo determinar si aumenta la preferencia por una sustancia inicialmente apetitiva desde el punto de vista de su palatabilidad al asociarla con sacarina. Como ya sabemos, la sacarina carece de poder nutritivo pero tiene un marcado sabor dulce, por lo que el desarrollo de la preferencia por la solución condicionada sólo podría responder a un mecanismo de aprendizaje sabor-sabor. Para probar esta idea, los sujetos de este experimento recibieron durante la fase de condicionamiento y en días sucesivos la exposición a dos sabores (uva y cereza), uno de ellos (EC+) combinado en la misma disolución con sacarina (EI) y el otro presentado como sabor único (). Los sabores se contrabalancearon en todo momento para evitar cualquier influencia incondicionada. En la prueba de preferencia posterior los sujetos mostraron su elección entre los dos sabores (EC+ vs EC-) presentados por separado. Si se desarrolla la preferencia gustativa, debería observarse un aumento en el consumo de la solución (EC+) proporcionada conjuntamente con sacarina frente a la solución alternativa (EC-) presentada durante el condicionamiento de forma aislada. En cuanto al cambio en la valoración hedónica del sabor condicionado, al tenor de lo obtenido en los experimentos anteriores, no debería producirse un aumento de las reacciones apetitivas evocadas por el animal durante la prueba de reactividad al sabor, ya que el incremento de su valor hedónico requiere de la asociación con una solución con propiedades nutritivas o calóricas, es decir, la mediación de un proceso de aprendizaje sabor-nutriente.

8.1.1. Sujetos y soluciones

Los sujetos utilizados en este experimento fueron 20 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*) procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Las ratas tenían tres meses de edad y un peso medio al comienzo del experimento de 284 gramos (rango 247-335 g). Al llegar al laboratorio, los animales fueron alojados y mantenidos en las condiciones ambientales descritas en el capítulo 5 sobre material y método general. Durante la realización del experimento los animales estuvieron sometidos a un programa de privación de bebida recibiendo una cantidad limitada de agua cada día según se expone en la sección del procedimiento.

Como estímulos gustativos (ECs) se utilizaron sabores apetitivos (uva y cereza) desde el punto de vista de su palatabilidad inicial, obtenidos a partir de saborizantes comerciales Kool Aid (Kraft Foods Global Inc. IL 60093-2753 USA) diluidos en agua destilada a una concentración del 0,05%. Para inducir la preferencia condicionada se empleó como EI una solución de sacarina diluida también en agua destilada al 0,1%.

8.1.2. Procedimiento

Se empleó un procedimiento análogo a los experimentos anteriores con la salvedad de que se adaptó a un diseño experimental intra-sujetos. En la Tabla 14 se muestra un esquema del procedimiento general con los cambios llevados a cabo en las diferentes fases del estudio que se describen a continuación:

En primer lugar se sometió a los animales al programa de privación habitual, con acceso a agua durante 60 minutos diarios y 4 sesiones de 10 minutos de exposición a agua en los tubos calibrados situados en el centro las jaulas para habituarlos a este método y mantener un nivel de motivación estable durante todo el experimento.

Antes de iniciar la fase de condicionamiento se realizó una prueba previa o pre-test de 10 minutos en el que se proporcionó a los animales las soluciones de uva y cereza en los tubos calibrados situados en las jaulas experimentales. Cada tubo contenía una de las soluciones, recibiendo la mitad de los sujetos una de las soluciones en el lado izquierdo de la jaula y el resto en la parte derecha. Transcurridos 5 minutos desde el comienzo de la prueba, se intercambié el lado en el que se encontraba cada tubo de bebida en las jaulas. Este pre-test inicial nos serviría para determinar si ambos sabores eran igualmente preferidos por los animales al comienzo del experimento.

La fase de condicionamiento consistió en 4 ciclos de dos sesiones cada uno. En la primera sesión de cada ciclo, los animales tenían acceso durante 10 minutos a un tubo de bebida con uno de los sabores (uva o cereza), al que denominamos EC- ya que se presentó de forma aislada. El segundo día de cada ciclo los sujetos tenían acceso también durante 10 minutos a la solución gustativa alternativa (EC+) mezclada en la misma disolución con la solución de sacarina (EI). El tipo de sabor se contrabalanceó entre los animales, de modo que la mitad de los sujetos recibió el sabor a uva como EC+ y el sabor a cereza como EC-, siendo lo inverso para el resto de sujetos.

Una prueba de preferencia final, similar al pre-test, en la que los sujetos debían elegir entre los dos sabores (EC+ vs EC-) permitió determinar si el condicionamiento había sido efectivo para promover el desarrollo de una preferencia gustativa por el sabor proporcionado previamente en compuesto con la solución de sacarina.

Tras la prueba de preferencia condicionada se implantaron las cánulas a los animales en la cavidad bucal de cara a la prueba de reactividad al sabor. Durante el periodo de recuperación de la intervención quirúrgica 1 de los sujetos perdió la cánula implantada por lo que fue retirado del experimento quedando una muestra total de 19

sujetos. Tras el periodo de recuperación se llevó a cabo la sesión de habituación al aparato de reactividad, recibiendo cada animal una infusión intraoral de 1 ml de agua destilada durante 1 minuto (tasa de infusión 1 ml/min).

En la prueba de reactividad al sabor, realizada al día siguiente, los sujetos recibieron una infusión de 3 ml de cada uno de los sabores (EC+ y EC-) durante 3 minutos (tasa de infusión 1 ml/min), con un intervalo entre las infusiones de 4 horas. La infusión de las soluciones tuvo lugar a las 09:00 y a las 13:00 horas. El orden de exposición a los fluidos se contrabalanceó entre los sujetos, recibiendo la mitad de ellos en primer lugar la infusión con el sabor EC+ y luego la infusión con el sabor EC-, con el orden inverso para el resto de animales. Durante las infusiones se registraron las respuestas orofaciales de los animales para su posterior análisis y cuantificación.

Finalmente, como en los experimentos anteriores, se realizó una prueba de extinción donde los animales recibieron la exposición simultánea a los dos sabores (EC+ y EC-) siguiendo el mismo método que en la pruebas de preferencia. Esta fase de extinción se prolongó durante 3 sesiones idénticas realizadas en días sucesivos.

Tabla 14. Diseño del Experimento 7

Pre-test	Entrenamiento x 4		Test	Canulación	Habitución	TRT	Extinción x 3
EC+	EC-	EC+	EC+	Implante de cánula en la cavidad oral	1 ml	3 ml EC+	EC+
vs		Sacarina	vs		Agua	3 ml EC-	vs
EC-		EC-	EC-		IO	IO	EC-

Nota. TRT: test de reactividad al sabor; IO: administración intraoral

8.1.3. Resultados

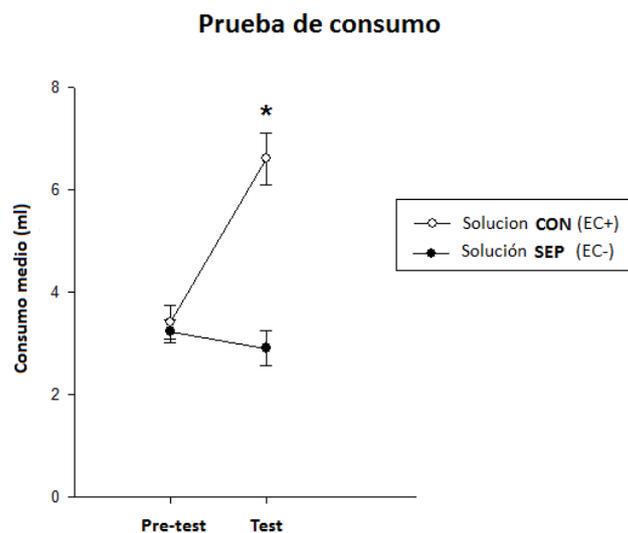
8.1.3.1. Prueba de consumo

Como se muestra en la Figura 10a, en la prueba inicial (pre-test) los animales mostraron un consumo similar de las soluciones gustativas (uva y cereza), indicando que no hubo una preferencia incondicionada por cualquiera de los sabores. En cambio, durante la prueba realizada tras la fase de condicionamiento los animales prefirieron el sabor (EC+) que habían recibido conjuntamente con sacarina, en comparación con el sabor presentado solo (EC-). Este resultado indica que la experiencia conjunta de un sabor con sacarina produce un incremento en la preferencia condicionada por esa solución, un resultado que replica los obtenidos en los experimentos anteriores con sacarina como reforzador (Experimentos 1 y 4). Un ANOVA de medidas repetidas con los datos de la prueba inicial (pre-test), siendo el Sabor (uva o cereza) el factor inter-sujetos y el tipo de Exposición (conjunta o separada) el factor intra-sujetos, mostró que no hubo efecto de estos dos factores ni de su interacción [$F_{5(1,17)} \leq 2,789$; $ps \geq 0,113$]. Este resultado indica que en la prueba de preferencia inicial no hubo diferencias en cuanto al consumo de los animales debido al tipo de sabor proporcionado (uva o cereza). Un análisis similar con los consumos de la prueba de preferencia realizada tras el condicionamiento reveló, sin embargo, un efecto significativo del tipo de exposición [$F_{(1,17)} = 20,184$; $p < 0,001$], pero no del sabor ni interacción entre estos dos factores [$F_{5(1,17)} \leq 1,230$; $ps \geq 0,283$]. Esto indica que en la prueba hubo un consumo mayor del sabor (EC+) que se había proporcionado de forma conjunta con la sacarina durante el condicionamiento respecto al consumo del sabor presentado de forma aislada (EC-) e independientemente de la naturaleza del mismo.

Confirmando la descripción anterior, una comparación del consumo del sabor asociado con sacarina (EC+) en las dos pruebas de preferencia, con el Sabor (uva/cereza) como factor inter-sujetos y las Sesiones (pre-test/test) como factor intra-sujetos, mostró un efecto significativo de las Sesiones [$F_{(1,17)} = 32,050$; $p < 0,001$] pero no del Sabor ni de la interacción Sesiones x Sabor [$F_{5(1,17)} \leq 1,457$; $ps \geq 0,244$]. Este resultado indica un incremento en el consumo del sabor EC+ como consecuencia del condicionamiento. Por su parte, la comparación del consumo del sabor EC- en las dos pruebas mostró que no hubo un efecto significativo de las Sesiones ni tampoco del Sabor empleado o de la interacción Sesiones x Sabor [$F_s < 1$], lo que indica que no cambió la preferencia por esta solución como consecuencia del condicionamiento.

La Tabla 15a muestra los consumos para las diferentes condiciones de exposición (EC+ y EC-) durante las sesiones de pre-test y de prueba. En la Tabla 15b se observan los consumos en la fase de condicionamiento para cada solución correspondiente.

Figura 10a. Experimento 7: Prueba de consumo.



Nota. Consumo medio (ml) de las soluciones CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante las pruebas de consumo (Pre-test y Test). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 15a. Experimento 7: Ingesta de las diferentes soluciones en la prueba de consumo

Solución	Pre-test	Test
SEP (EC-)	3,24 ($\pm 0,23$)	2,91 ($\pm 0,35$)
CON (EC+)	3,42 ($\pm 0,33$)	6,61 ($\pm 0,52$)

Nota. Consumo medio (ml) de los sabores CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante la prueba de preferencia inicial (Pre-test) y en la prueba de consumo realizada tras el condicionamiento (Test). Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 15b. Experimento 7: Consumos registrados durante la fase de condicionamiento

1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
8,03 ($\pm 0,33$)	7,83 ($\pm 0,45$)	8,24 ($\pm 0,24$)	10,64 ($\pm 0,44$)	8,53 ($\pm 0,34$)	10,82 ($\pm 0,40$)	8,35 ($\pm 0,31$)	10,21 ($\pm 0,28$)

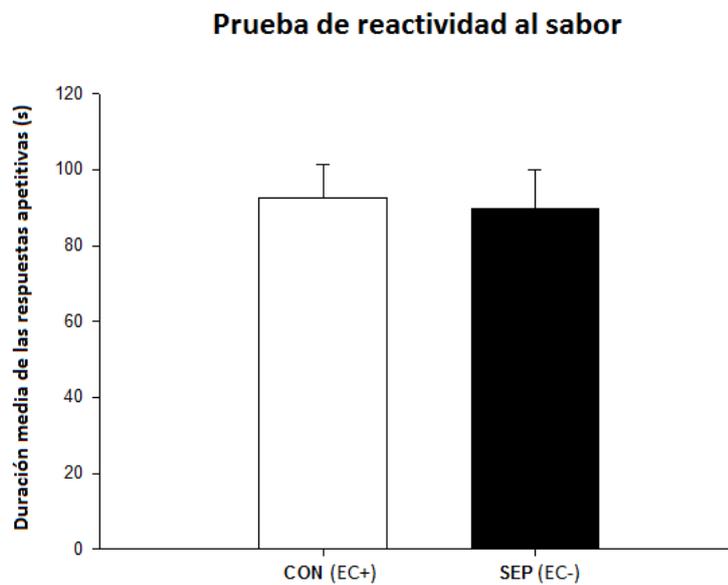
Nota. Consumo medio (ml) de los sabores CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante la fase de condicionamiento. Los ensayos A refieren a la presentación del sabor solo (EC-) y los ensayos B al sabor asociado con sacarina (EC+).

8.1.3.2. Prueba de reactividad al sabor

Respuestas apetitivas

Como se observa en la Figura 10b, los sujetos mostraron durante esta prueba un número similar y elevado de respuestas apetitivas ante la infusión de ambos sabores (EC+ y EC-). Un ANOVA de medidas repetidas realizado con las puntuaciones de esta prueba, con el Sabor (uva o cereza) como factor inter-sujetos y el tipo de Exposición a los sabores (conjunta o separada) como factor intra-sujetos, indicó que no hubo efecto significativo del tipo de Exposición, del Sabor o de la interacción entre ellos [$F_s < 1$].

Figura 10b. Experimento 7: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad

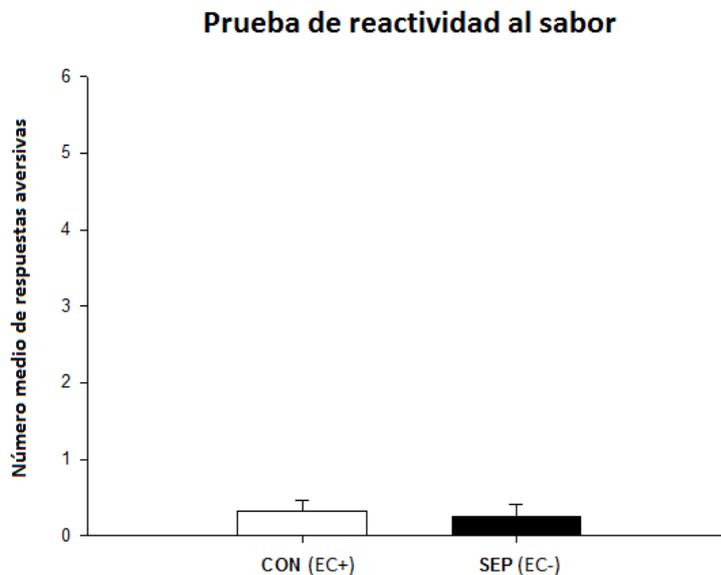


Nota. Duración media (en segundos) de las respuestas apetitivas mostradas por los sujetos en la prueba de reactividad ante la infusión de los sabores CON (EC+): exposición conjunta; y SEP (EC-): exposición separada. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Respuestas aversivas

Por otra parte, el número de respuestas aversivas emitidas por los animales durante la prueba de reactividad al sabor fue prácticamente inexistente ante ambas soluciones, como se puede apreciar en la Figura 10c. El análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con el Sabor (uva o cereza) como factor inter-sujetos y el tipo de Exposición a los sabores (conjunta o separada) como factor intra-sujetos, mostró que no hubo diferencias entre las dos soluciones, EC+ y EC-, dependiendo del sabor empleado (uva o cereza) o de la experiencia con sacarina o por separado [$F_s < 1$].

Figura 10c. Experimento 7: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad



Nota. Número medio de respuestas aversivas mostradas por los animales durante la infusión del sabor CON (EC+): presentación conjunta, y del sabor SEP (EC-): presentación separada. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Los resultados de la prueba de reactividad indican que no hubo diferencias en cuanto al número de respuestas apetitivas y aversivas realizadas por los animales durante la infusión de ambos sabores (EC+ y EC-). En consecuencia, podemos concluir que el incremento en el consumo del sabor asociado con sacarina (EC+) derivado del condicionamiento, no se vio acompañado por cambios en la valoración hedónica del sabor condicionado.

En la Tabla 15c se muestran los valores promedio para las dos categorías de respuestas (apetitivas y aversivas) analizadas en la prueba de reactividad.

Tabla 15c. Experimento 7: Respuestas registradas en la prueba de reactividad al sabor

Solución	Respuestas Apetitivas	Respuestas Aversivas
SEP (EC-)	89,91 ($\pm 9,91$)	0,26 ($\pm 0,15$)
CON (EC+)	92,55 ($\pm 8,85$)	0,32 ($\pm 0,15$)

Nota. Duración media de las respuestas apetitivas y número medio de respuestas aversivas mostradas por los animales durante la infusión de los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, en la prueba de reactividad. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

8.1.3.1. Prueba de extinción

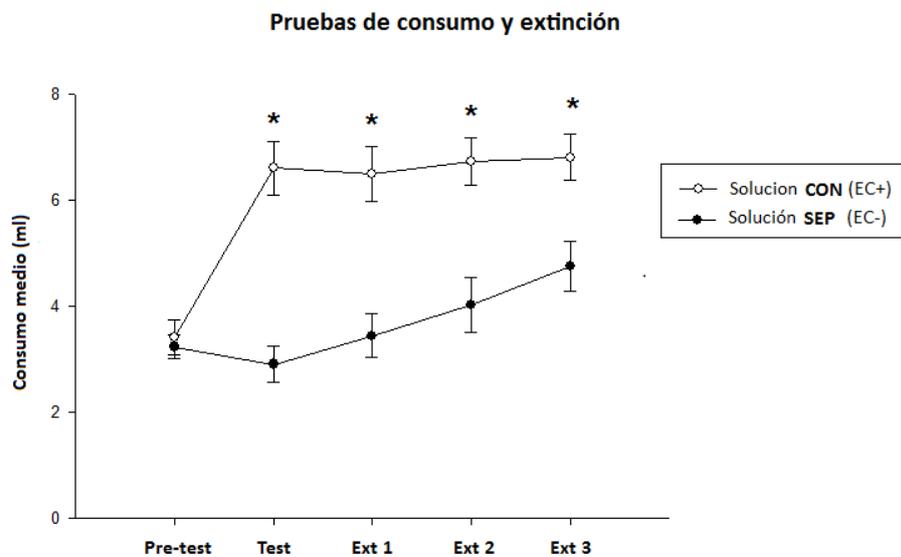
Finalmente, como se muestra en la Figura 10d, durante los ensayos de extinción se mantuvo el consumo de la solución asociada con sacarina (EC+) al nivel observado en la prueba de preferencia final, indicando un fuerte efecto de resistencia a la extinción de la preferencia condicionada. Por su parte, el consumo de la solución presentada sola (EC-) aumentó progresivamente a lo largo de las sesiones de extinción, debido probablemente a la exposición repetida a la misma. Un ANOVA de medidas repetidas contrastando el consumo de cada sabor (EC+ y EC-) en los ensayos de extinción, siendo el Sabor (uva o cereza) el factor inter-sujetos y el tipo de Exposición (conjunta o separada) el factor intra-sujetos, indicó un efecto significativo del factor Exposición en las tres sesiones de extinción [$F_{\underline{2}(1,17)} \geq 5,271$; $ps \leq 0,029$], pero no del factor Sabor ni de la interacción [$F_s < 1$]. Esto indica que la diferencia de consumos entre el sabor presentado de forma conjunta (EC+) y el sabor presentado solo (EC-) se mantuvo durante los ensayos de extinción revelando un fuerte efecto del aprendizaje.

Para examinar los cambios durante la fase de extinción en el consumo del sabor condicionado (EC+), un ANOVA de medidas repetidas con el Sabor (uva o cereza) como factor inter-sujetos y las 4 Sesiones de extinción (incluida la sesión de prueba) como factor intra-sujeto, mostró que no hubo un efecto significativo de estos factores ni de su interacción [$F_s < 1$]. Esto indica que, con independencia del sabor, el consumo de la solución condicionada (EC+) se mantuvo alto y estable en los ensayos de extinción. En cuanto a la solución que se presentó sola (EC-), el ANOVA de medidas repetidas con los mismos factores indicó que no hubo efectos significativos del Sabor, de las Sesiones o de la interacción entre ambos [$F_{(1,17)} \leq 1,445$; $p \geq 0,246$]. Esto indica que, aunque la experiencia repetida con el sabor no condicionado (EC-) favorezca un incremento del

consumo de esta solución, este incremento no determinó las diferencias de consumo entre los dos sabores, EC+ y EC-, observadas durante la fase de extinción.

Los consumos medios de las dos soluciones, sabor presentado (EC+ y EC-) durante los ensayos de extinción se muestran en la Tabla 15d.

Figura 10d. Experimento 7: Prueba de extinción



Nota. Consumo medio de los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, durante las pruebas de consumo (Pre-test, Test) y durante los ensayos de extinción (Ext 1, 2 y 3). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 15d. Experimento 7: Consumos registrados durante la prueba de extinción

Solución	Extinción 1	Extinción 2	Extinción 3
SEP (EC-)	3,45 (\pm 0,41)	4,03 (\pm 0,52)	4,75 (\pm 0,47)
CON (EC+)	6,50 (\pm 0,52)	6,73 (\pm 0,45)	8,81 (\pm 0,44)

Nota. Consumo medio de los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, durante los ensayos de extinción. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

8.2. Experimento 8

Preferencia condicionada por sabores apetitivos y sacarosa como EI

El segundo experimento de esta serie tuvo como objetivo examinar los posibles cambios en la valoración hedónica de un sabor inicialmente apetitivo (uva y cereza) tras su condicionamiento con sacarosa, una solución que, como se ha dicho anteriormente, posee propiedades nutritivas además de la cualidad sensorial del dulzor. Como se concluyó de los experimentos realizados anteriormente con limón como EC (Experimentos 2 y 5), su asociación con sacarosa como reforzador promueve una fuerte preferencia condicionada cuando se estima con una prueba de consumo además de un aumento de las respuestas apetitivas que produce esta solución durante la prueba de reactividad al sabor. En el presente experimento nos proponemos evaluar si se produce un incremento hedónico similar cuando la solución de sacarosa se asocia con una sustancia inicialmente apetitiva, lo que reforzaría la idea de que el aumento en la valoración hedónica de los sabores tras el condicionamiento de la preferencia obedece a su asociación con las consecuencias nutritivas o calóricas de la solución reforzante.

Como en el experimento anterior, los sujetos de este estudio recibieron durante el condicionamiento la exposición repetida a dos sabores pero, en este caso, uno se presentó en compuesto con sacarosa (EC+) y el otro sin la solución endulzante (EC-). Tras el condicionamiento se realizó la prueba de elección o de preferencia entre los dos sabores (EC+ vs EC-) ambos sin solución endulzante. Sobre la base de los resultados obtenidos con anterioridad siendo sacarosa el reforzador, en la prueba de preferencia se debería observar un aumento en el consumo de la solución que se ha

asociado con sacarosa (EC+) en comparación con la solución alternativa presentada sin consecuencias reforzantes (EC-). Por otro lado, el hecho de que el reforzador de sacarosa posea un componente nutritivo debería fomentar la transferencia de sus propiedades hedónicas al EC+. Esto debería expresarse en la prueba de reactividad en un aumento de las reacciones apetitivas emitidas por el sabor asociado previamente con sacarosa (EC+) en comparación con el sabor no reforzado (EC-).

8.2.1. Sujetos y soluciones

Los sujetos empleados para este experimento fueron 20 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*) procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Las ratas tenían unos tres meses de edad y un peso medio al comienzo del experimento de 288 gramos (rango 222-352 g). Al llegar al laboratorio, los animales se alojaron y se controlaron tal y como se describe en el capítulo 5 sobre material y método general.

Como estímulos gustativos (EC) se utilizaron los mismos sabores de uva y cereza utilizados en experimento anterior, con saborizantes comerciales Kool Aid (Kraft Foods Global Inc. IL 60093-2753 USA) diluidos en agua destilada al 0,05% de concentración. Como El se empleó una solución de sacarosa diluida también en agua destilada al 8%.

8.2.2. Procedimiento

El procedimiento utilizado en este experimento con sacarosa, siguió las mismas pautas que el experimento previo realizado con sacarina. En la Tabla 16 se muestra un esquema general con las diferentes fases, que se describen a continuación:

Tras el programa habitual de privación de agua, se realizó un pre-test en el que se proporcionaban dos tubos calibrados a cada animal en centro de la jaula durante 10 minutos, cada uno con una solución gustativa diferente (uva o cereza). La posición inicial de los sabores fue contrabalanceada como en el experimento previo y transcurridos 5 minutos de prueba, se intercambié el lado de cada tubo de bebida. Así pues, si los sabores de uva y cereza eran isopreferidos este pre-test lo confirmaría.

La fase de condicionamiento consistió en 4 ciclos de dos sesiones cada uno. En la primera sesión de cada ciclo, los animales tenían 10 minutos de acceso a un tubo con

uno de los sabores (uva o cereza) de forma aislada (EC-). Durante el segundo día, la solución gustativa alternativa (EC+) se proporcionaba conjuntamente con la solución de sacarosa durante otros 10 minutos, contrabalanceando los diferentes sabores.

Una prueba de preferencia (EC+ vs EC-) similar al pre-test determinaba si el entrenamiento había sido efectivo para desarrollar la preferencia por el sabor EC+, proporcionado de forma conjunta con la sacarina.

Tras la prueba, los animales fueron intervenidos para implantarles las cánulas intraorales de cara a la prueba de reactividad. Tras la operación, 1 de los sujetos fue eliminado del experimento por haber perdido su cánula durante el periodo de recuperación, quedando 19 sujetos que recibieron la sesión de habituación.

En la prueba de reactividad se administró a todos los sujetos una infusión de 3 ml de cada solución (EC+ y EC-) durante 3 minutos (tasa de infusión 1 ml/min) registrando las reacciones orofaciales. La primera infusión se realizó a primera hora de la mañana (09:00) y la segunda infusión a última hora de la mañana (13:00). El orden de presentación de los fluidos fue contrabalanceado com en el experimento anterior.

Finalmente se realizó una prueba de extinción en las mismas condiciones que el pre-test y la prueba, prolongándose durante 3 sesiones realizadas en días sucesivos.

Tabla 16. Diseño del Experimento 8

Pre-test	Entrenamiento x 4		Test	Canulación	Habitución	TRT	Extinción x 3
EC+	EC-	EC+ Sacarosa	EC+	Implante de cánula en la cavidad oral	1 ml	3 ml EC+	EC+
vs			vs		Agua	3 ml EC-	vs
EC-			EC-		IO	IO	EC-

Nota. TRT: test de reactividad al sabor; IO: administración intraoral

8.2.3. Resultados

8.2.3.1. Prueba de consumo

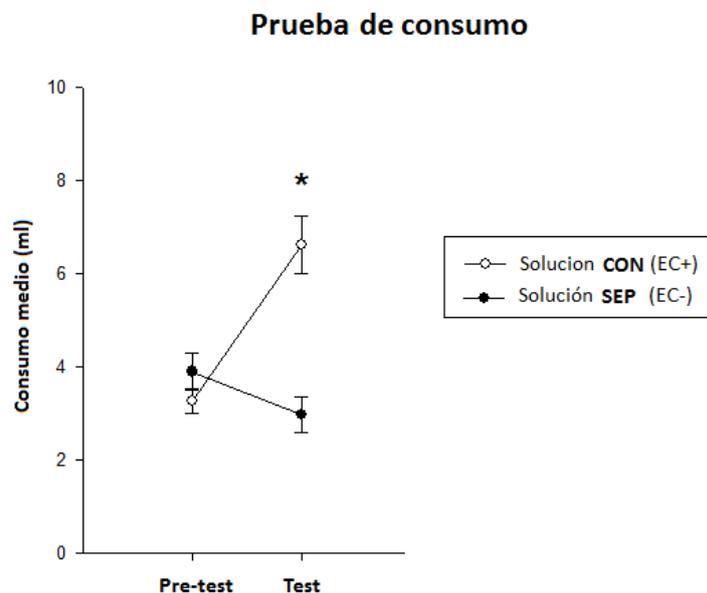
Como se muestra en la Figura 11a, en la prueba inicial (pre-test) ambos sabores se consumieron de forma similar. Sin embargo, en la prueba realizada tras la fase de entrenamiento, el consumo del sabor (EC+) que fue presentando conjuntamente con la sacarosa fue mayor que el consumo del sabor que se presentó solo (EC-). Esto indica que la experiencia conjunta de un sabor con la sacarosa incrementó la preferencia condicionada por esa solución, resultado que también se obtuvo en los experimentos previos con sacarosa (experimentos 2 y 5). Un ANOVA de medidas repetidas con los consumos del pre-test, siendo el Sabor suministrado (uva o cereza) el factor inter-sujetos y el tipo de Exposición (conjunta o separada) el factor intra-sujetos, mostró una ausencia de efecto para el factor Exposición, para el factor Sabor y para la interacción entre ambos [$F_{S(1,17)} \leq 1,285$; $ps \geq 0,273$]. Este resultado indica que en la prueba inicial hubo diferencias en el consumo de los diferentes sabores, EC+ y EC-, con independencia del sabor. Un ANOVA idéntico para los consumos en la prueba tras el condicionamiento, indicó un efecto del factor Exposición [$F_{(1,17)} = 13,732$; $p = 0,002$], pero no del factor Sabor ni de la interacción [$F_{S(1,17)} \leq 1,253$; $ps \geq 0,279$]. Este resultado indica una diferencia significativa en la prueba, entre el consumo del sabor con exposición conjunta (EC+) y el consumo del sabor que se presentó de forma separada (EC-), con independencia del sabor (uva o cereza).

Por otro lado, si observamos los consumos de la solución conjunta (EC+) en ambas fases y realizamos un ANOVA de medidas repetidas con el Sabor (uva o cereza) como factor inter-sujetos y las Sesiones (pre-test y prueba) como factor intra-sujetos,

observamos un efecto claro del factor Sesiones [$F_{(1,17)} = 28,190$; $p < 0,001$], pero sin efecto del factor Sabor ni de la interacción [$F_{s(1,17)} \leq 1,442$; $ps \geq 0,246$]. Este resultado nos muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el consumo de la solución conjunta (EC+) entre el pre-test y la prueba, sin que exista un efecto del sabor. Finalmente, otro ANOVA idéntico pero para el consumo del sabor que se presentó solo (EC-), no mostró ningún efecto para los factores ni para la interacción [$F_{s(1,17)} \leq 2,732$; $ps \geq 0,117$], indicando una ausencia de diferencias entre el pre-test y la prueba en cuanto al consumo de la solución que se proporcionó de forma aislada (EC-).

En la Tabla 17a se muestran los consumos en las sesiones de pre-test y prueba para las diferentes condiciones (EC+ y EC-). Así mismo, la Tabla 17b muestra los consumos durante la fase de condicionamiento para cada solución correspondiente.

Figura 11a. Experimento 8: Prueba de consumo.



Nota. Consumo medio (ml) de las soluciones CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante las pruebas de consumo (Pre-test y Test). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 17a. Experimento 8: Ingesta de las diferentes soluciones en la prueba de consumo

Solución	Pre-test	Test
SEP (EC-)	3,90 ($\pm 0,41$)	2,98 ($\pm 0,38$)
CON (EC+)	3,26 ($\pm 0,26$)	6,66 ($\pm 0,61$)

Nota. Consumo medio (ml) de los sabores CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante la prueba de preferencia inicial (Pre-test) y en la prueba de consumo realizada tras el condicionamiento (Test). Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 17b. Experimento 8: Consumos registrados durante la fase de condicionamiento

1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
7,15 ($\pm 0,39$)	8,74 ($\pm 0,37$)	8,27 ($\pm 0,38$)	12,22 ($\pm 0,40$)	9,98 ($\pm 0,58$)	13,06 ($\pm 0,45$)	10,66 ($\pm 0,43$)	14,92 ($\pm 0,52$)

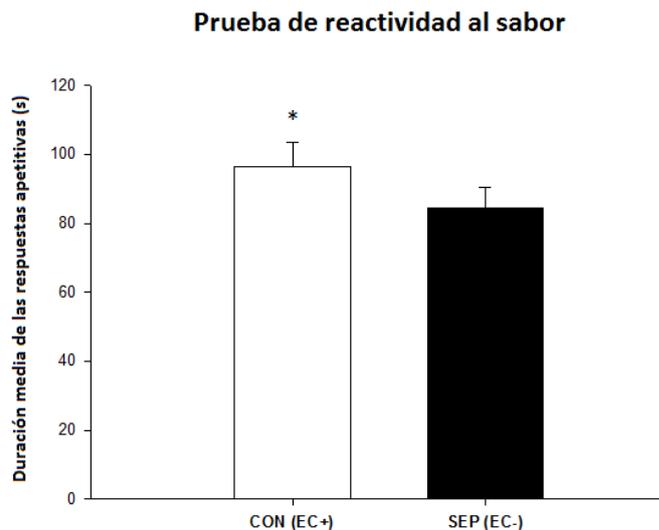
Nota. Consumo medio (ml) de los sabores CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante la fase de condicionamiento. Los ensayos A refieren a la presentación del sabor solo (EC-) y los ensayos B al sabor asociado con sacarosa (EC+).

8.2.3.2. Prueba de reactividad al sabor

Respuestas apetitivas

La Figura 11b muestra un gran número de respuestas apetitivas ante la infusión de ambos sabores (EC+ y EC-) por parte de los sujetos, pero con un incremento en las respuestas apetitivas ante el sabor EC+, presentado de forma conjunta con la sacarosa durante el condicionamiento. Un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con el Sabor (uva o cereza) como factor inter-sujetos y el tipo de Exposición a los sabores (conjunta o separada) como factor intra-sujetos, indicó un efecto significativo del factor Exposición [$F_{(1,17)} = 10,404$; $p = 0,005$] pero no del factor Sabor ni tampoco de la interacción Exposición x Sabor [$F_s < 1$]. Esto indica una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al número de respuestas apetitivas realizadas por los animales ante las diferentes soluciones (EC+ y EC-), independientemente de su sabor.

Figura 11b. Experimento 8: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad

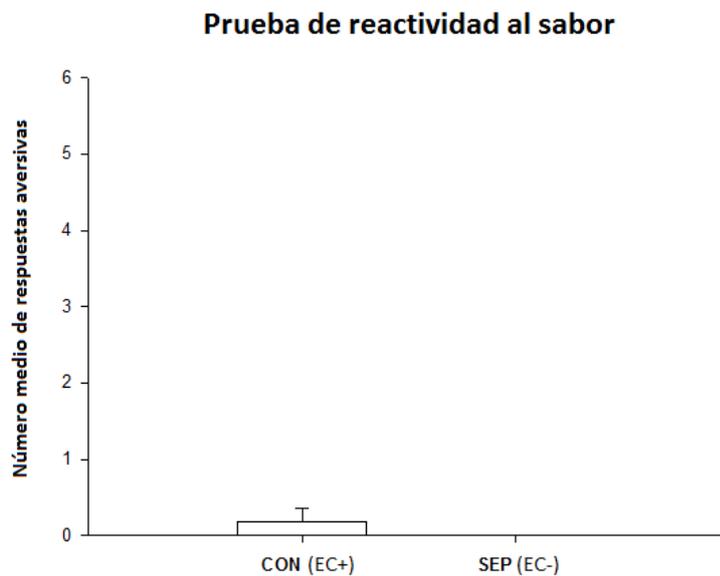


Nota. Duración media (en segundos) de las respuestas apetitivas mostradas por los sujetos en la prueba de reactividad ante la infusión de los sabores CON (EC+): exposición conjunta; y SEP (EC-): exposición separada. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Respuestas aversivas

Por otra lado, la Figura 11c muestra un número muy similar y casi inexistente de respuestas aversivas ante las infusiones de la solución condicionada (EC+) y la solución sola (EC-), tal y como ocurría en el experimento previo con sacarina. Un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con el Sabor (uva o cereza) como factor inter-sujetos y el tipo de Exposición a los sabores (conjunta o separada) como factor intra-sujetos, confirmó una ausencia de efecto para ambos factores, Exposición y Sabor, y también para la interacción [$F_s < 1$], confirmando que no existían diferencias significativas entre ambas soluciones (EC+ y EC-) en cuanto al número de respuestas aversivas, independientemente de su sabor.

Figura 11c. Experimento 8: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad



Nota. Número medio de respuestas aversivas mostradas por los animales durante la infusión del sabor CON (EC+): presentación conjunta, y del sabor SEP (EC-): presentación separada. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Los resultados de la prueba de reactividad indican una transferencia de las propiedades hedónicas de la solución de sacarosa al sabor EC+, como lo demuestra el mayor número de reacciones apetitivas al sabor condicionado. Este resultado no se obtiene en el experimento anterior utilizando sacarina como EI, con sabor dulce y sin componente nutritivo, lo que es congruente con los resultados de las series experimentales anteriores. Respecto a las reacciones aversivas, fueron muy escasas y no hubo diferencias en su magnitud ante la infusión de ambos sabores (EC+ y EC-). En consecuencia, podemos concluir que el incremento en el consumo del sabor (EC+) asociado con sacarosa, ahora si se vio acompañado por un aumento en la valoración hedónica de la solución.

La Tabla 17c presenta los valores promedio para los diferentes tipos de respuestas analizadas en esta prueba para cada condición de exposición (EC+ y EC-).

Tabla 17c. Experimento 8: Respuestas registradas en la prueba de reactividad al sabor

Solución	Respuestas Apetitivas	Respuestas Aversivas
SEP (EC-)	86,09 ($\pm 5,84$)	0,00 ($\pm 0,00$)
CON (EC+)	97,11 ($\pm 5,92$)	0,21 ($\pm 0,21$)

Nota. Duración media de las respuestas apetitivas y número medio de respuestas aversivas mostradas por los animales durante la infusión de los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, en la prueba de reactividad. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

8.2.3.1. Prueba de extinción

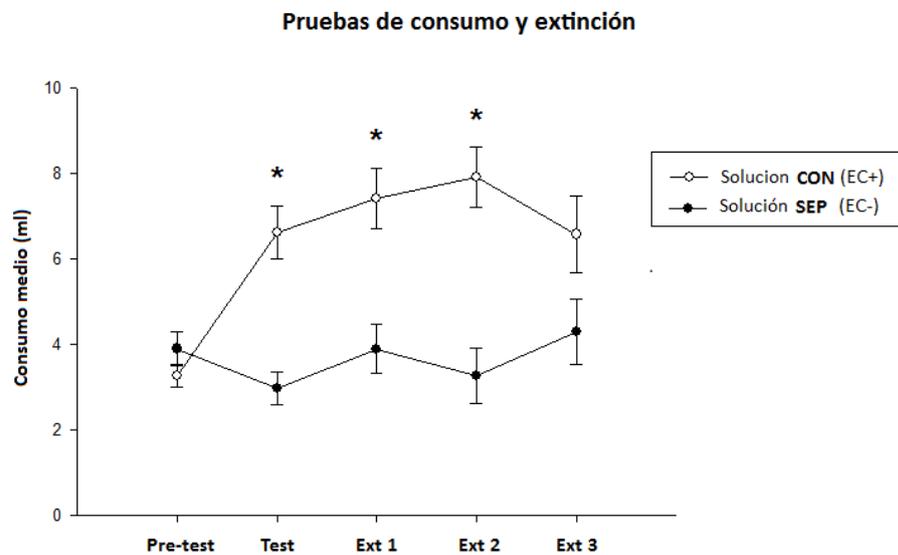
Por último, durante los ensayos de extinción se observó un patrón similar al experimento con sacarina, donde el consumo de la solución conjunta (EC+) se mantuvo en unos valores similares a la prueba (ver Figura 11d), indicando una fuerte resistencia a la extinción. Por su parte, se observó también un ligero aumento a lo largo de las sesiones de extinción en el consumo de la solución sola (EC-). Un ANOVA de medidas repetidas para contrastar los consumos de las soluciones en las sesiones de extinción, siendo el Sabor (uva o cereza) el factor inter-sujetos y el tipo de Exposición (conjunta o separada) el factor intra-sujetos, puso de manifiesto un efecto del factor Exposición en las primeras 2 sesiones de extinción [$F_{\underline{S}(1,17)} \geq 7,362$; $ps \leq 0,015$], pero no del factor Sabor ni de la interacción Exposición x Sabor [$F_{S(1,17)} \leq 2,532$; $ps \geq 0,130$]. Sin embargo, en la tercera sesión de extinción ya no se hubo efecto de ningún factor ni de la interacción [$F_{S(1,17)} \leq 1,859$; $ps \geq 0,191$]. Estos datos indican que, con independencia del sabor, existen diferencias estadísticamente significativas entre el sabor presentado de forma conjunta (EC+) y el sabor presentado solo (EC-) durante las primeras dos sesiones de extinción y que desaparecen en la última de las sesiones de esta prueba.

De la misma forma, para observar si existían diferencias en el consumo del sabor (EC+) presentado de forma conjunta con la sacarosa a lo largo de las sesiones de extinción, un análisis ANOVA de medidas repetidas con el Sabor (uva o cereza) como factor inter-sujetos y las Sesiones de extinción (incluida la prueba), no mostró efecto de ningún factor ni de la interacción [$F_s < 1$]. Este resultado indica que el consumo de la solución condicionada (EC+) se mantuvo constante en la prueba de extinción, independientemente de su sabor. De la misma forma, para evaluar el consumo de la solución que se presentó sola (EC-), un análisis idéntico al anterior tampoco reveló

efecto de ningún factor ni de la interacción [$F_s < 1$]. Esto indica que, aunque la mera exposición a la solución no condicionada (EC-) provocara un ligero aumento en su consumo, las diferencias a lo largo de las sesiones de extinción no fueron significativas.

Los consumos medios durante la sesiones de extinción para ambas soluciones, conjunta (EC+) y separada (EC-), se muestran en la Tabla 17d.

Figura 11d. Experimento 8: Prueba de extinción



Nota. Consumo medio de los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, durante las pruebas de consumo (Pre-test, Test) y durante los ensayos de extinción (Ext 1, 2 y 3). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 17d. Experimento 8: Consumos registrados durante la prueba de extinción

Solución	Extinción 1	Extinción 2	Extinción 3
SEP (EC-)	3,45 (\pm 0,41)	4,03 (\pm 0,52)	4,75 (\pm 0,47)
CON (EC+)	6,50 (\pm 0,52)	6,73 (\pm 0,45)	8,81 (\pm 0,44)

Nota. Consumo medio de los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, durante los ensayos de extinción. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

8.3. Experimento 9

Preferencia condicionada por sabores apetitivos y maltodextrina como EI

El objetivo del tercer experimento de esta serie fue la evaluación del cambio en la preferencia por una sustancia gustativa apetitiva (uva o cereza) asociándola con una solución de maltodextrina. Esta solución carece del componente dulce de las soluciones empleadas en los dos experimentos anteriores (sacarina y sacarosa), pero posee el mismo valor calórico que la sacarosa. Además, aludiendo a los experimentos de las series anteriores en los que se utilizó ácido cítrico como EC y maltodextrina como EI (experimentos 3 y 6), sabemos de su efectividad para el desarrollo de una preferencia condicionada por el sabor en base al establecimiento de asociaciones del tipo sabor-nutriente. Para este fin, los sujetos participantes recibían de forma contrabalanceada uno de los sabores (EC+) combinado en la misma disolución con la maltodextrina (EI) durante la fase de condicionamiento, mientras que el sabor alternativo lo recibían solo (EC-). Los resultados deberían mostrar de nuevo un aumento en el consumo de la solución (EC+) que se proporcionó conjuntamente con esta solución, independientemente de cuál fuese el sabor de ésta. Además, las cualidades nutritivas que caracterizan a la maltodextrina deberían fomentar la transferencia de sus propiedades hedónicas al EC+ (como se observó en los experimentos 3 y 6) pero podría ocurrir que la influencia del valor hedónico inicial de los sabores de uva y cereza hiciera que el número de respuestas apetitivas mostradas ante la infusión del sabor solo (EC-) fuese lo suficientemente alto como para camuflar esa transferencia de propiedades hedónicas derivadas del componente calórico que posee la maltodextrina.

8.3.1. Sujetos y soluciones

Los sujetos empleados para este experimento fueron 16 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*) procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Las ratas tenían alrededor de tres meses de edad y un peso medio al comienzo del experimento de 265 gramos (rango 211-332 g). Al llegar al laboratorio, fueron alojados y controlados como se describe en el capítulo 5 sobre material y método general.

Como estímulos gustativos (EC) se utilizaron los mismos sabores de uva y cereza que se utilizaron en los experimentos anteriores de esta serie, a base de saborizantes comerciales Kool Aid (Kraft Foods Global Inc. IL 60093-2753 USA) diluidos en agua destilada a una concentración del 0,05%. Como EI se empleó una solución de maltodextrina diluida también en agua destilada al 8% para inducir la preferencia.

8.3.2. Procedimiento

En este experimento con maltodextrina se siguió un procedimiento idéntico a los experimentos previos de esta serie (con sacarina y sacarosa). La Tabla 18 muestra el esquema general, con las diferentes fases que ahora se describen:

Instaurado el programa habitual de privación de agua, se proporcionó a cada sujeto durante 10 minutos dos tubos calibrados en el centro de la jaula, cada uno con una solución gustativa diferente (uva o cereza) a modo de pre-test, que indicaría si ambos sabores eran isopreferidos.

La fase de condicionamiento constaba, como siempre, de 4 ciclos de dos sesiones cada uno. En la primera sesión, los animales tenían acceso durante 10 minutos a uno de los sabores (uva o cereza) de forma aislada (EC-) mientras que en la segunda sesión

tenían acceso al sabor alternativo (EC+) proporcionado de forma conjunta con la solución de maltodextrina, también durante otros 10 minutos.

La prueba de preferencia (EC+ vs EC-) determinó si el entrenamiento había sido efectivo para el desarrollo de una preferencia condicionada por el sabor EC+ y, tras la prueba, se procedió a la implantación de las cánulas intraorales a los animales. Durante el periodo de recuperación 3 sujetos perdieron su cánula y fueron apartados del experimento, quedando un total de 13 sujetos a los que se les proporcionó 1 ml de agua destilada durante 1 minuto (tasa de infusión 1 ml/min) en la fase de habituación.

En la prueba de reactividad se administraron dos infusiones a todos los sujetos, una a primera hora de la mañana (09:00) y la segunda a última hora de la mañana (13:00). En cada infusión se administraban 3 ml de una de las soluciones (EC+ o EC-) durante 3 minutos (tasa de infusión 1 ml/min), registrando las reacciones orofaciales. El orden de presentación de los fluidos en la prueba fue contrabalanceado de la misma forma que en el experimento anterior.

Finalmente, se llevó a cabo la realización de una prueba de extinción que constó de 3 sesiones sucesivas, idénticas al pre-test y a la prueba.

Tabla 18. Diseño del Experimento 9

Pre-test	Entrenamiento x 4		Test	Canulación	Habituaación	TRT	Extinción x 3
EC+	EC-	EC+ Maltodextrina	EC+	Implante de cánula en la cavidad oral	1 ml	3 ml EC+	EC+
vs			vs		Agua	3 ml EC-	vs
EC-			EC-		IO	IO	EC-

Nota. TRT: test de reactividad al sabor; IO: administración intraoral

8.3.3. Resultados

8.3.3.1. Prueba de consumo

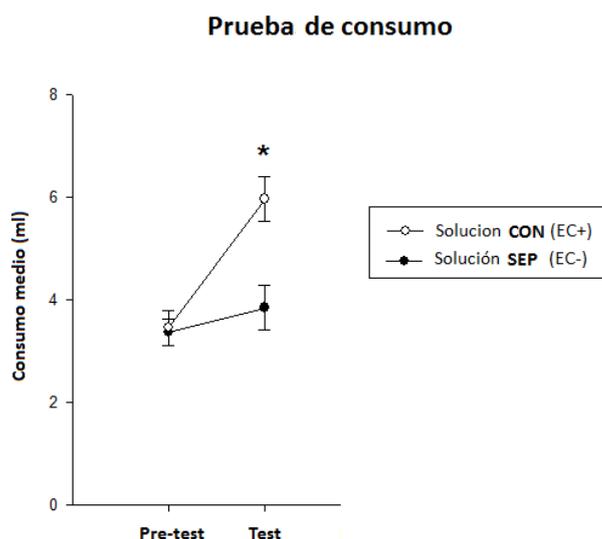
En la prueba inicial o pre-test, como ocurrió en los experimentos anteriores y como muestra la Figura 12a, los consumos de las diferentes soluciones fueron similares. En cambio, en la prueba realizada tras el condicionamiento el consumo del sabor (EC+) presentando de forma conjunta con la maltodextrina fue superior al consumo del sabor que se presentó de forma aislada (EC-). Esto indica, como en los experimentos anteriores con maltodextrina (experimentos 3 y 6), que la experiencia conjunta de un sabor con esta sustancia nutritiva incrementó la preferencia condicionada por el sabor de esa solución. Un ANOVA de medidas repetidas con los datos de la prueba inicial (pre-test), siendo el Sabor suministrado (uva o cereza) el factor inter-sujetos y el tipo de Exposición (conjunta o separada) el factor intra-sujetos confirmó esta impresión, destacando una ausencia de efecto en el pre-test para ambos factores, Exposición y Sabor, y también para la interacción [$F_{S(1,11)} \leq 1,640$; $ps \geq 0,227$]. Este resultado indica que los animales consumieron de forma similar ambas soluciones, independientemente de su sabor. Un análisis idéntico para los consumos de las soluciones registrados en la prueba realizada después del condicionamiento reveló un efecto del factor Exposición [$F_{(1,11)} = 5,948$; $p = 0,033$], pero no del factor Sabor ni de la interacción [$F_s < 1$]. Este resultado indica una diferencia estadísticamente significativa entre el consumo de la solución conjunta (EC+) y el consumo de la solución sola (EC-) en la prueba, independientemente del sabor.

Por otro lado, analizando los consumos de la solución conjunta (EC+) en ambas fases (pre-test y prueba) mediante un ANOVA de medidas repetidas con el Sabor

(uva/cereza) como factor inter-sujetos y las Sesiones (pre-test/test) como factor intra-sujetos, se observa un claro efecto del factor Sesiones [$F_{(1,11)} = 13,234$; $p = 0,004$], pero no del factor Sabor ni de la interacción [$F_s < 1$]. Este resultado indica la existencia de una diferencia estadísticamente significativa en el consumo de la solución conjunta (EC+) entre el pre-test y la prueba, independientemente de su sabor. Un análisis de varianza idéntico pero evaluando el consumo del sabor solo (EC-) entre el pretest y la prueba indicó una ausencia de efecto para los factores y para la interacción [$F_s < 1$]. Esto se traduce en una ausencia de diferencias significativas entre el pre-test y la prueba en cuanto al consumo de la solución que se proporcionó sola (EC-).

En la Tabla 19a se muestran los consumos del pre-test y de la prueba para las diferentes condiciones de tratamiento (EC+ y EC-). Los consumos para cada solución correspondiente durante la fase de condicionamiento se observan en la Tabla 19b.

Figura 12a. Experimento 9: Prueba de consumo



Nota. Consumo medio (ml) de las soluciones CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante las pruebas de consumo (Pre-test y Test). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 19a. Experimento 9: Ingesta de las diferentes soluciones en la prueba de consumo

Solución	Pre-test	Test
SEP (EC-)	3,38 ($\pm 0,26$)	3,85 ($\pm 0,44$)
CON (EC+)	3,46 ($\pm 0,34$)	5,97 ($\pm 0,44$)

Nota. Consumo medio (ml) de los sabores CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante la prueba de preferencia inicial (Pre-test) y en la prueba de consumo realizada tras el condicionamiento (Test). Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 19b. Experimento 9: Consumos registrados durante la fase de condicionamiento

1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
8,10 ($\pm 0,31$)	6,08 ($\pm 0,36$)	8,76 ($\pm 0,44$)	10,96 ($\pm 0,26$)	8,79 ($\pm 0,26$)	12,78 ($\pm 0,43$)	9,30 ($\pm 0,33$)	13,75 ($\pm 0,36$)

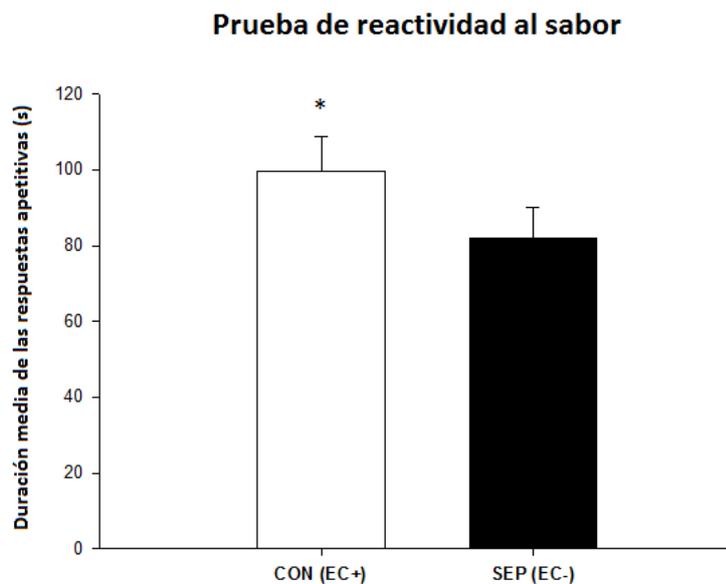
Nota. Consumo medio (ml) de los sabores CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante la fase de condicionamiento. Los ensayos A refieren a la presentación del sabor solo (EC-) y los ensayos B al sabor asociado con maltodextrina (EC+).

8.3.3.2. Prueba de reactividad al sabor

Respuestas apetitivas

El número de respuestas apetitivas mostrado por los animales ante la infusión de ambos sabores (EC+ y EC-) en el test de reactividad fue algo más elevado para el sabor EC+ (ver Figura 12b). Un ANOVA de medidas repetidas realizado con las puntuaciones de esta prueba, con el Sabor (uva o cereza) como factor inter-sujetos y el tipo de Exposición a los sabores (conjunta o separada) como factor intra-sujetos, destacó un efecto del factor Exposición [$F_{(1,11)} = 5,006$; $p = 0,047$] pero no hubo efecto del Sabor ni de la interacción [$F_{S(1,11)} \leq 2,342$; $ps \geq 0,154$], confirmando que existían diferencias significativas en el número de respuestas apetitivas realizadas por los animales ante las infusiones de las diferentes soluciones (EC+ y EC-) con independencia de su sabor.

Figura 12b. Experimento 9: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad

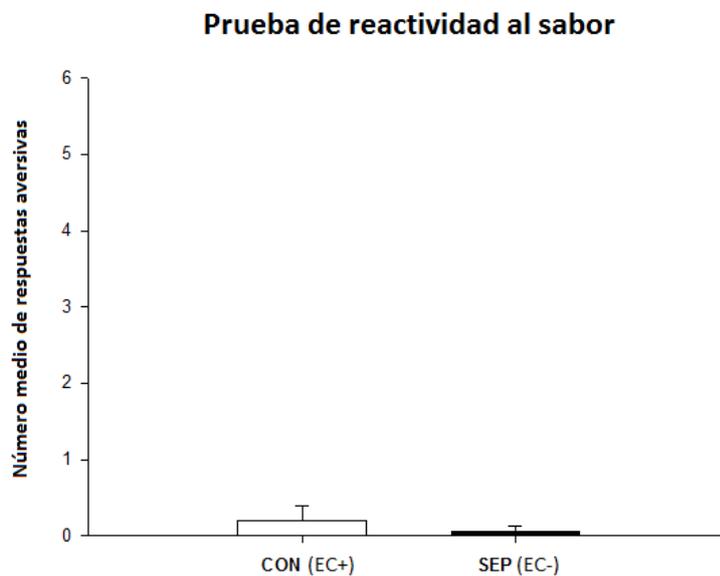


Nota. Duración media (en segundos) de las respuestas apetitivas mostradas por los sujetos en la prueba de reactividad ante la infusión de los sabores CON (EC+): exposición conjunta; y SEP (EC-): exposición separada. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Respuestas aversivas

Por otra lado, la Figura 12c muestra un número casi inexistente de respuestas aversivas ante las infusiones de la solución condicionada (EC+) y de la solución sola (EC-). Otro análisis idéntico al anterior pero para las reacciones aversivas, puso de manifiesto que no existía ningún efecto de los factores Exposición y Sabor, ni tampoco de la interacción [$F_{s(1,11)} \leq 1,757$; $ps \geq 0,212$]. Estos resultados confirman la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de respuestas aversivas a ambas soluciones (EC+ y EC-), independientemente de su sabor.

Figura 12c. Experimento 9: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad



Nota. Número medio de respuestas aversivas mostradas por los animales durante la infusión del sabor CON (EC+): presentación conjunta, y del sabor SEP (EC-): presentación separada. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Los resultados obtenidos en la prueba de reactividad indican una transferencia de las propiedades hedónicas de la solución de maltodextrina al sabor EC+, que se refleja en una tasa superior de respuestas apetitivas al sabor condicionado. Este resultado se obtiene también en el experimento anterior realizado con sacarosa como EI. Sin embargo, cuando se utiliza sacarina como EI este efecto no se encuentra, corroborando que la asociación sabor-cualidades hedónicas está mediada por el componente nutritivo de la solución EI.

Por otro lado, el hecho de utilizar sabores apetitivos como EC provocó que las tasa de reacciones aversivas fuera muy baja, no encontrando diferencias ante la infusión de ambos sabores (EC+ y EC-) en la prueba de reactividad.

En la Tabla 19c se muestran los valores promedio para las dos categorías de respuestas (apetitivas y aversivas) analizadas en la prueba de reactividad.

Tabla 19c. Experimento 9: Respuestas registradas en la prueba de reactividad al sabor

Solución	Respuestas Apetitivas	Respuestas Aversivas
SEP (EC-)	83,85 ($\pm 5,16$)	0,07 ($\pm 0,07$)
CON (EC+)	99,00 ($\pm 7,48$)	0,23 ($\pm 0,23$)

Nota. Duración media de las respuestas apetitivas y número medio de respuestas aversivas mostradas por los animales durante la infusión de los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, en la prueba de reactividad. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

8.3.3.1. Prueba de extinción

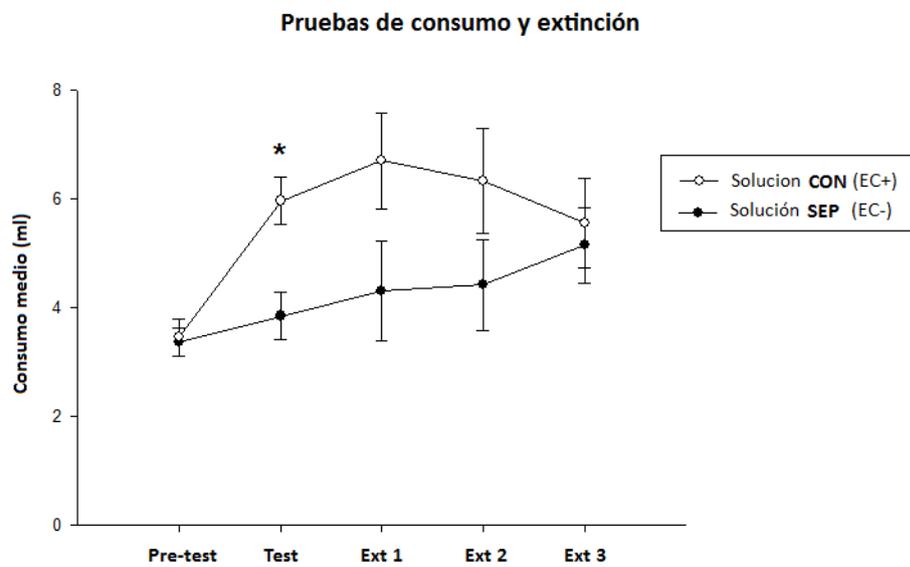
Por último, en los ensayos de extinción se observó un patrón ligeramente diferente al resto de experimentos de esta serie (ver Figura 12d). Aunque el consumo de la solución conjunta (EC+) se mantuvo en unos valores similares a la prueba, el volumen global consumido para esta solución durante todo el experimento no fue tan alto como en los experimentos anteriores con sacarina y sacarosa. En este sentido, el aumento en el consumo de la solución sola (EC-) por mera exposición, provocó que los consumos de ambas soluciones se igualaran con más celeridad. Un ANOVA de medidas repetidas evaluando el consumo de las soluciones (EC+ y EC-) para cada una de las pruebas, siendo el Sabor (uva o cereza) el factor inter-sujetos y el tipo de Exposición (conjunta o separada) el factor intra-sujetos, indicó que no existía efecto alguno de los factores Exposición y Sabor, ni tampoco de interacción entre ambos en ninguna de las 3 sesiones de extinción [$F_{S(1,11)} \leq 3,110$; $ps \geq 0,106$]. Estos datos confirman que las diferencias entre el sabor conjunto (EC+) y el sabor solo (EC-) existentes en la prueba, se pierden tras esta sesión en los ensayos de extinción.

Así mismo, para observar los cambios en el consumo del sabor (EC+) presentado conjuntamente con la maltodextrina, otro ANOVA de medidas repetidas con el Sabor (uva o cereza) como factor inter-sujetos y las 4 Sesiones de extinción (incluida la sesión de prueba) como factor intra-sujeto, indicó una ausencia de efecto ambos factores Sabor y Sesiones, al igual que para la interacción [$F_s < 1$]. Este resultado indica que el consumo de la solución condicionada (EC+) se mantuvo constante a lo largo de las sesiones de extinción, con independencia de su sabor. Un ANOVA de medidas repetidas idéntico al realizado anteriormente, pero ahora para evaluar el consumo de la solución que se presentó sola (EC-), indicó una ausencia de efecto para los factores

(Sabor y Sesiones) y para la interacción [$F_s < 1$]. Esto indica que, aunque la mera exposición a la solución no condicionada (EC-) aumente su consumo, este aumento no es suficiente para generar diferencias significativas durante las sesiones de extinción.

Los consumos medios durante la sesiones de extinción para ambas soluciones, conjunta (EC+) y sola (EC-), se muestran en la Tabla 19d.

Figura 12d. Experimento 9: Prueba de extinción



Nota. Consumo medio de los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, durante las pruebas de consumo (Pre-test, Test) y durante los ensayos de extinción (Ext 1, 2 y 3). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 19d. Experimento 9: Consumos registrados durante la prueba de extinción

Solución	Extinción 1	Extinción 2	Extinción 3
SEP (EC-)	4,32 (\pm 0,92)	4,42 (\pm 0,84)	5,15 (\pm 0,70)
CON (EC+)	6,70 (\pm 0,88)	6,33 (\pm 0,96)	5,56 (\pm 0,82)

Nota. Consumo medio de los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, durante los ensayos de extinción. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

8.4. Experimento 10

Efecto de la devaluación del reforzador con sabores apetitivos

La estrategia de este último experimento de la serie fue dissociar la contribución relativa de cada tipo de asociación, aprendizaje sabor-sabor y sabor-nutriente, a los cambios hedónicos producidos durante el condicionamiento de una preferencia gustativa con sacarosa como solución reforzante. Para ello se empleó el paradigma de devaluación del reforzador con cloruro de litio (LiCl). Como se vio en un capítulo anterior (ver Capítulo 7), en el caso de sabores moderadamente aversivos como el sabor a limón, el efecto de la devaluación sobre las propiedades hedónicas de ese sabor dependió de la naturaleza del reforzador empleado para inducir la preferencia gustativa. Concretamente, cuando la solución reforzante fue sacarina, su devaluación posterior con cloruro de litio redujo la preferencia gustativa por el limón previamente establecida pero no afectó a las cualidades hedónicas; esto es, la solución condicionada (limón) mantuvo su valor hedónico durante la prueba de reactividad al sabor. Por el contrario, cuando el reforzador empleado para condicionar la preferencia por el limón había sido una solución nutritiva como sacarosa y maltodextrina, en ambos casos, la devaluación con litio redujo la preferencia por el limón previamente establecida al tiempo que afectó a su valor hedónico reduciendo las respuestas apetitivas emitidas por los animales durante la infusión de la solución. Estos resultados se interpretaron como evidencia de que los cambios hedónicos producidos durante el aprendizaje de preferencias gustativas responden a la formación de una asociación sabor-nutriente. Sin embargo, dado que la solución de sacarosa también posee

propiedades sensoriales como el dulzor, una asociación sabor-sabor podría contribuir también al proceso de aprendizaje de la preferencia condicionada.

En este experimento, tras el condicionamiento de una preferencia gustativa por un sabor neutro/apetitivo (uva o cereza) por su asociación con sacarosa, se devaluaron por separado las propiedades sensoriales (dulzor) y nutritivas de la solución reforzante de sacarosa, dos cualidades que pudieran contribuir al desarrollo de la preferencia condicionada. Esto se realizó devaluando en unos sujetos el componente sensorial de la solución de sacarosa mediante la asociación de sacarina con los efectos aversivos de una inyección de cloruro de litio; en otros sujetos se devaluó su componente nutritivo asociando una solución de maltodextrina con el litio y, finalmente, en otra condición se devaluaron ambos aspectos asociando la solución de sacarosa directamente con litio. A tenor de lo observado en los experimentos anteriores con la técnica de devaluación, es de esperar que la devaluación por separado de las cualidades sensoriales y nutritivas de la sacarosa afectase de forma selectiva a las propiedades hedónicas adquiridas por el sabor con el que se asoció durante el desarrollo de la preferencia condicionada. Más específicamente, la hipótesis de trabajo es que la devaluación del componente nutritivo del reforzador, pero no de su componente sensorial, reduzca las propiedades hedónicas apetitivas adquiridas por el sabor durante el condicionamiento de la preferencia gustativa.

8.4.1. Sujetos y soluciones

Los sujetos utilizados en este experimento fueron 32 ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus Norvegicus*) procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo, con tres meses de edad al comienzo del experimento y un peso medio de 324 gramos (rango 280-381 g). Los animales fueron alojados en el laboratorio y mantenidos en las condiciones ambientales descritas en el Capítulo 5 sobre material y método general.

Como estímulos gustativos (EC) se emplearon los mismos sabores (uva y cereza) utilizados en los experimentos anteriores de esta serie, concretamente dos saborizantes de la marca Kool Aid (Kraft Foods Global Inc. IL 60093-2753 USA) diluidos en agua destilada a una concentración del 0,05%. Como solución reforzante (EI) para inducir la preferencia condicionada se empleó una solución de sacarosa diluida también en agua destilada al 8%. Las soluciones empleadas durante la fase de devaluación fueron una solución de sacarina al 0,1%, una solución de sacarosa al 8% y una solución de maltodextrina al 8%, todas ellas preparadas con agua destilada.

8.4.2. Procedimiento

El procedimiento llevado a cabo en este experimento siguió un esquema similar a los experimentos previos de esta serie con sacarina, sacarosa y maltodextrina como reforzador pero con algunas modificaciones determinadas por el objetivo particular del estudio. La Tabla 20 resume el diseño del experimento con las diferentes fases del procedimiento empleado.

Tras someter a los animales al programa de privación de bebida se realizó la prueba inicial de preferencia incondicionada por las soluciones de uva y cereza. Para

ello se proporcionaron los sabores a los animales en tubos calibrados durante 10 minutos, en el centro de las jaulas hogar y contrabalanceando la posición. Se registró la cantidad consumida de cada solución pesando los tubos antes y después de la prueba.

La fase de condicionamiento constó de 4 ciclos de dos sesiones cada uno. En la primera sesión de cada ciclo los animales recibieron la exposición a uno de los sabores (uva o cereza) de forma aislada (EC-) durante 10 minutos. En la segunda sesión recibieron el sabor alternativo (EC+) mezclado en la misma disolución con sacarosa (8%). Los sabores fueron contrabalanceados en todo momento. Tras los ensayos de condicionamiento se realizó una nueva prueba de preferencia entre los sabores (EC+ vs EC-) que permitió determinar la magnitud de la preferencia condicionada por el sabor asociado con la solución de sacarosa.

Una vez realizada la prueba se procedió a implantar a los animales las cánulas intraorales para la prueba de reactividad al sabor siguiendo el procedimiento descrito en los experimentos anteriores. Tras el periodo de recuperación se realizó la sesión de habituación al aparato de reactividad. Para ello se administró a los animales 1 ml de agua a través de la cánula durante 1 minuto (tasa de infusión: 1 ml/min).

En la prueba de reactividad se administró a los sujetos una infusión de 3 ml durante 3 minutos (tasa de infusión 1 ml/min) de cada uno de los sabores (EC+ y EC-), la primera a las 09:00 horas y la segunda a las 13:00 horas. Durante la prueba se contrabalanceó el orden de exposición a los fluidos, de modo que la mitad de los sujetos recibió el sabor EC+ durante la primera infusión y el sabor EC- en la segunda infusión, siendo lo inverso para el resto de los animales. Durante la infusión de los fluidos se registraron las respuestas orofaciales de los animales para su posterior análisis y cuantificación.

Seguidamente se llevó a cabo la fase de devaluación que constó de dos sesiones. Los sujetos se asignaron a tres condiciones, devaluación con sacarina, maltodextrina o sacarosa. En la primera sesión los sujetos de la condición “sacarina” recibieron una exposición de 10 minutos a esta solución; por su parte los sujetos asignados a las condiciones “maltodextrina” y “sacarosa” recibieron durante esta primera sesión la solución correspondiente. Inmediatamente después se proporcionó a los animales una inyección intraperitoneal de cloruro de litio (20ml/kg de LiCl .15M). Durante la segunda sesión todos los animales tuvieron acceso libre a agua para la recuperación de los efectos negativos de la inyección de litio.

Tras la fase de devaluación se llevó a cabo una nueva prueba de elección entre los dos sabores, idéntica al pre-test y al test (EC+ vs EC-) que permitiría conocer si la preferencia desarrollada por el sabor asociado con la sacarosa (EC+) se vio afectada por la devaluación de cada uno de los componentes presentes en la solución reforzante. Finalmente, se llevó a cabo otra prueba de reactividad con ambos sabores (EC+ y EC-), similar a la realizada tras la fase de condicionamiento, para determinar si la devaluación de cada componente (sensorial y nutritivo) afectó de diferente modo a las cualidades hedónicas adquiridas por los sabores durante el condicionamiento .

Tabla 20. Diseño del Experimento 10

Pre-test	Entrenamiento x 4		Test	Canulación	TRT 1	Devaluación		Post-test	TRT 2
EC+	EC-	EC+ Sacarosa	EC+	Implante de cánula en la cavidad oral	3 ml EC+	Sacarina → LiCl	Agua	EC+	3 ml EC+
vs			EC-		3 ml EC-	Sacarosa → LiCl		vs	3 ml EC-
EC-			EC-		IO	Maltodextrina → LiCl		EC-	IO

Nota. TRT: test de reactividad al sabor; IO: administración intraoral;

8.4.3. Resultados

8.4.3.1. Prueba de consumo

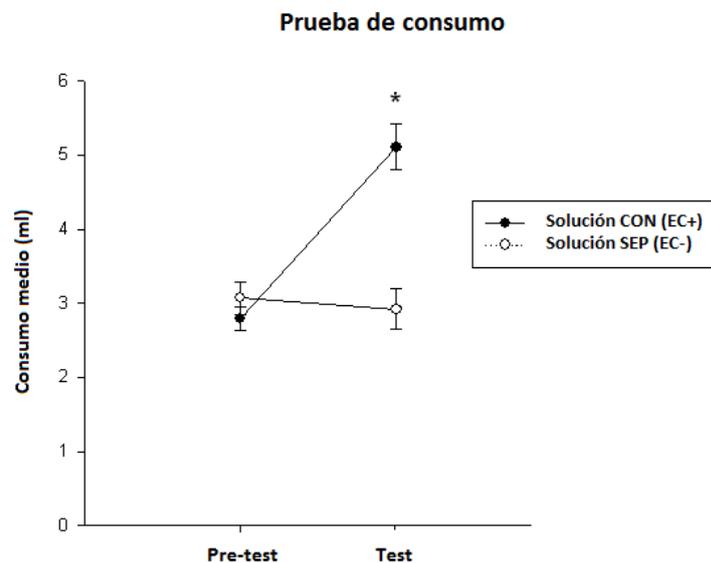
Como en los experimentos anteriores de esta serie, los consumos de las dos sabores, EC+ y EC-, fueron similares durante la prueba inicial de preferencia (pre-test), como se puede apreciar en la Figura 13a. También, en la prueba de preferencia realizada tras el condicionamiento (test), el consumo de la solución proporcionada con sacarosa (EC+) fue superior al de la solución presentada sola (EC-), indicando que la experiencia conjunta del sabor con la solución de sacarosa incrementó la preferencia por dicho sabor. Un ANOVA de medidas repetidas con los factores Sabor (uva o cereza) como variable inter-sujetos y el tipo de Exposición a los sabores (conjunta o separada), mostró que no hubo diferencias en cuanto a la cantidad consumida de ambos sabores durante la prueba de preferencia inicial (pre-test). El efecto de ambos factores y de la interacción entre ellos no resultó significativo [$F_s < 1$], confirmando que los animales no tenían una preferencia incondicionada por uno de los sabores a emplear el condicionamiento. Un ANOVA similar con los consumos de las soluciones registrados durante la prueba de preferencia (test) reveló un efecto significativo del factor Exposición [$F_{(1,30)} = 16,967$; $p < 0,001$], pero no del Sabor utilizado ni de la interacción [$F_s < 1$]. El análisis realizado prueba el desarrollo de una preferencia condicionada por el sabor asociado con la solución de sacarosa. Este resultado confirma los obtenidos en los experimentos previos de esta serie con uva y cereza como ECs.

El análisis por separado del consumo de la solución conjunta (EC+) en las dos pruebas de preferencia realizadas, pre-test y test mediante un ANOVA de medidas repetidas con el Sabor y las Sesiones como variables, mostró un efecto significativo de

las Sesiones de prueba [$F_{(1,30)} = 41,858; p < 0,001$], pero no del Sabor o la interacción Sesiones x Sabor [$F_{5(1,30)} \leq 1,507; ps \geq 0,229$]. Esto indica que hubo un aumento en el consumo de la solución emparejada con sacarosa (EC+), independientemente de su sabor. Un análisis similar con los consumos del sabor presentado solo (EC-) mostró que no hubo efecto de las Sesiones o del Sabor y la interacción entre ellos [$F_s < 1$], lo que indica que el consumo de esta solución no aumentó tras el condicionamiento.

En la Tabla 21a se muestran los consumos de ambos sabores (EC+ y EC-) durante las dos pruebas de preferencia mencionadas. En la Tabla 21b se observan los consumos en la fase de condicionamiento para cada solución correspondiente.

Figura 13a. Experimento 10: Prueba de consumo



Nota. Consumo medio (ml) de las soluciones CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante las pruebas de consumo (Pre-test y Test). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM)

Tabla 21a. Experimento 10: Ingesta de las diferentes soluciones en la prueba de consumo

Solución	Pre-test	Test
SEP (EC-)	3,05 ($\pm 0,22$)	2,90 ($\pm 0,28$)
CON (EC+)	2,76 ($\pm 0,16$)	5,09 ($\pm 0,31$)

Nota. Consumo medio (ml) de los sabores CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante la prueba de preferencia inicial (Pre-test) y en la prueba de consumo realizada tras el condicionamiento (Test). Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 21b. Experimento 10: Consumos registrados durante la fase de condicionamiento

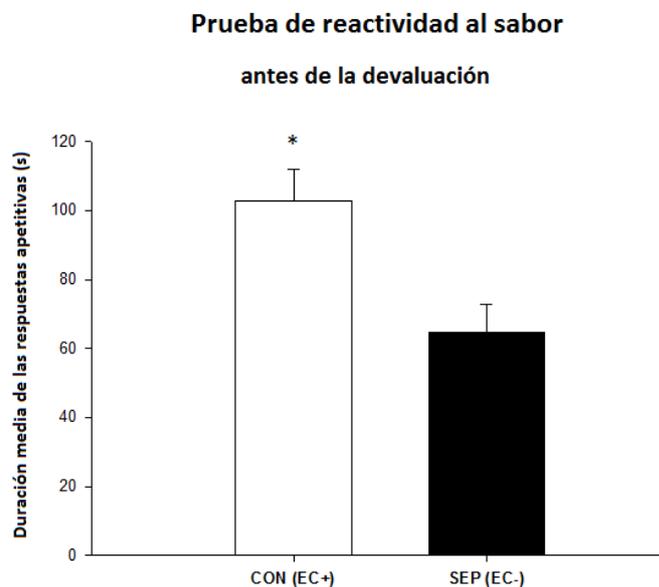
1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
5,95 ($\pm 0,19$)	5,51 ($\pm 0,37$)	6,84 ($\pm 0,17$)	10,63 ($\pm 0,30$)	7,46 ($\pm 0,21$)	10,75 ($\pm 0,47$)	6,82 ($\pm 0,30$)	11,84 ($\pm 0,30$)

Nota. Consumo medio (ml) de los sabores CON (EC+): exposición conjunta, y SEP (EC-): exposición separada, durante la fase de condicionamiento. Los ensayos A refieren a la presentación del sabor solo (EC-) y los ensayos B al sabor asociado con sacarosa (EC+).

8.4.3.2. Prueba de reactividad al sabor

El número de respuestas apetitivas emitidas por los sujetos durante la infusión del sabor condicionado (EC+) fue superior a las respuestas producidas por el sabor presentado aisladamente (EC-) (ver Figura 13b). Un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con el Sabor (uva o cereza) como factor inter-sujetos y el tipo de Exposición durante el condicionamiento (sabor con sacarosa o solo) como factor intra-sujetos, mostró un efecto significativo del tipo de Exposición a los sabores [$F_{(1,30)} = 40,675$; $p < 0,001$]. El factor Sabor o la interacción no resultaron significativos [$F_s < 1$].

Figura 13b. Experimento 10: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad

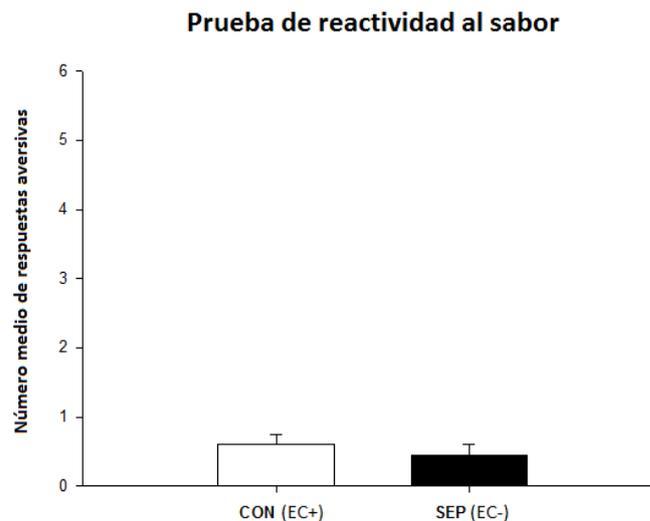


Nota. Duración media (en segundos) de las respuestas apetitivas mostradas por los sujetos en la prueba de reactividad ante la infusión de los sabores CON (EC+): exposición conjunta; y SEP (EC-): exposición separada. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Respuestas aversivas

En cuanto al número de respuestas aversivas emitidas por los animales durante la infusión de los sabores durante la prueba de reactividad (ver Figura 13c) fueron prácticamente inexistentes tanto con la infusión del EC+ como del EC-. Un ANOVA idéntico al anterior pero para de las reacciones aversivas mostró que no hubo efecto alguno del tipo de Exposición o del Sabor, ni tampoco de la interacción [$F_s < 1$].

Figura 13c. Experimento 10: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad



Nota. Número medio de respuestas aversivas mostradas por los animales durante la infusión del sabor CON (EC+): presentación conjunta, y del sabor SEP (EC-): presentación separada. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Estos datos confirman que el condicionamiento con sacarosa fue eficaz para incrementar las respuestas apetitivas evocadas por el sabor con el que se asoció, aumentando su valor hedónico. Por lo tanto, estos resultados son congruentes con los obtenidos en los experimentos previos con sacarosa como reforzador donde el aumento en la valoración afectiva de los sabores tras el condicionamiento de la preferencia responde a su asociación con las propiedades nutritivas de la sacarosa.

La Tabla 21c presenta los valores promedio para las dos categorías de respuestas examinadas, apetitivas y aversivas, en la prueba de reactividad con los sabores antes de llevarse a cabo la fase de devaluación.

Tabla 21c. Experimento 10: Respuestas registradas en la prueba de reactividad al sabor

Solución	Antes de la fase de devaluación	
	Respuestas Apetitivas	Respuestas Aversivas
SEP (EC-)	63,11 ($\pm 5,88$)	0,53 ($\pm 0,16$)
CON (EC+)	102,11 ($\pm 5,65$)	0,63 ($\pm 0,14$)

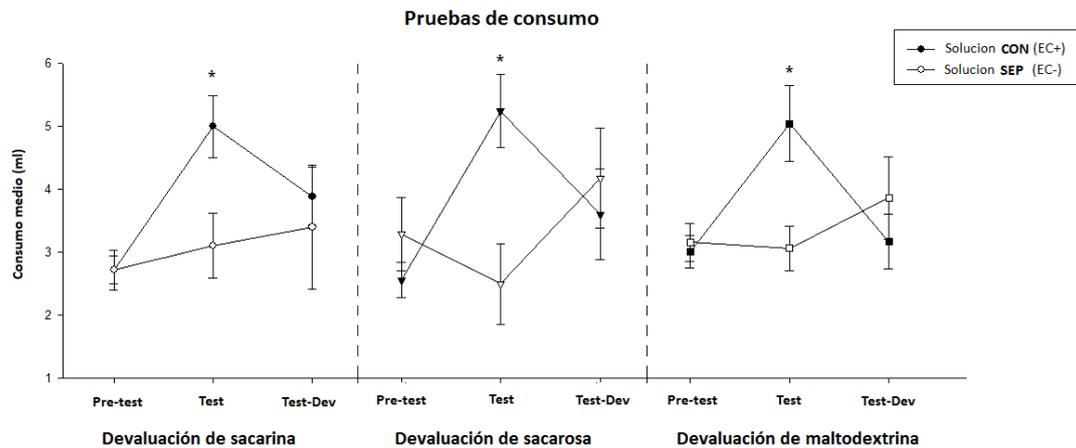
Nota. Duración media de las respuestas apetitivas y número medio de respuestas aversivas mostradas por los animales durante la infusión de los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, en la prueba de reactividad antes de la fase de devaluación. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

8.4.3.3. Prueba de consumo tras la devaluación

Como se muestra en la Figura 13d, tras la devaluación de las diferentes propiedades de la solución reforzante de sacarosa, se produjo un descenso apreciable en el consumo del sabor condicionado (EC+), indicando que la devaluación fue eficaz para reducir la preferencia previamente establecida. Esta reducción en el consumo del sabor se produjo con independencia de la solución (sacarina, maltodextrina o sacarosa) asociada con el cloruro de litio durante la fase de devaluación. Un análisis de varianza (ANOVA) con el Sabor proporcionado (uva o cereza) y la Devaluación (sacarina, maltodextrina o sacarosa) como factores inter-sujetos, y el tipo de Exposición con los sabores durante el condicionamiento (solo o con sacarosa) como variable intra-sujetos, mostró que no hubo un efecto significativo de la Exposición, del Sabor ni interacción Exposición x Sabor [$F_{S(1,26)} \leq 1,539$; $p_s \geq 0,226$]. El factor Devaluación tampoco fue significativo al igual que las interacciones Devaluación x Sabor, Exposición x Devaluación o la triple interacción [$F_{S(2,26)} \leq 1,345$; $p_s \geq 0,278$]. Se puede concluir del análisis anterior que la devaluación atenuó la preferencia condicionada previamente establecida por el sabor asociado con sacarosa (EC+), puesto que ya no existen diferencias en consumo respecto al tipo de exposición (EC+ y EC-), con independencia de la naturaleza de la solución devaluada.

En la Tabla 21d se muestran los consumos de todas las pruebas de en base a los grupos de devaluación. Se aprecia claramente que la diferencia entre los consumos de los sabores EC+ y EC- producida por el condicionamiento se redujo tras la devaluación, independientemente de la solución devaluada (sacarina, maltodextrina o sacarosa).

Figura 13d. Experimento 10: Prueba de consumo tras la devaluación



Nota. Consumo medio de los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, durante las pruebas de consumo inicial (Pre-test), la prueba de consumo después del condicionamiento con sacarosa (Test) y la prueba de consumo tras la devaluación (Test-Dev). Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Tabla 21d. Experimento 10: Consumos registrados durante las pruebas

Devaluación	Solución	Pre-test	Test	Test devaluación
Sacarina	CON (EC+)	2,71 (\pm 0,31)	5,00 (\pm 0,49)	3,89 (\pm 0,46)
	SEP (EC-)	2,71 (\pm 0,22)	3,10 (\pm 0,51)	3,40 (\pm 0,98)
Sacarosa	CON (EC+)	2,56 (\pm 0,28)	5,24 (\pm 0,58)	3,60 (\pm 0,72)
	SEP (EC-)	3,29 (\pm 0,58)	2,53 (\pm 0,64)	4,18 (\pm 0,79)
Maltodextrina	CON (EC+)	3,00 (\pm 0,26)	5,04 (\pm 0,60)	3,17 (\pm 0,43)
	SEP (EC-)	3,16 (\pm 0,30)	3,06 (\pm 0,35)	3,86 (\pm 0,66)

Nota. Consumo medio para los sabores CON (EC+): presentación conjunta, y SEP (EC-): presentación separada, registrado durante la prueba de preferencia inicial (Pre-test), la prueba realizada tras el condicionamiento (Test) y la prueba tras la devaluación (Test devaluación). Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

8.4.3.4. Prueba de reactividad tras la devaluación

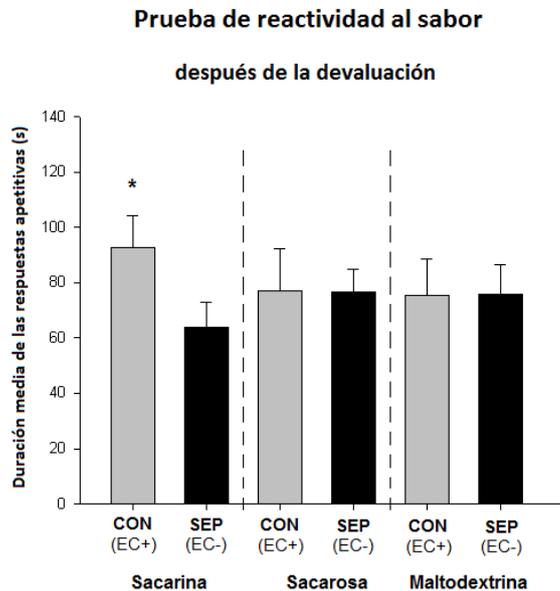
Respuestas apetitivas

El patrón de resultados obtenido en la prueba de reactividad al sabor realizada tras la fase de devaluación fue, como se esperaba, diferente al observado en la prueba de preferencia. Como se puede apreciar en la Figura 13e, en la condición de devaluación de la sacarina los animales mostraron un número más elevado de respuestas apetitivas ante la infusión del sabor condicionado (EC+) que ante el sabor presentado sin el reforzador (EC-). Este resultado indica que la devaluación de las propiedades sensoriales (dulzor) de la solución empleada como reforzador (sacarosa) no alteró la respuesta hedónica positiva adquirida por el sabor asociado con dicho reforzador. Por el contrario, en las condiciones de devaluación con soluciones nutritivas (sacarosa y maltodextrina), la devaluación de estas soluciones redujo las respuestas hedónicas apetitivas producidas por el sabor asociado con sacarosa durante el condicionamiento. Como se puede apreciar en la figura, tras la devaluación de las soluciones nutritivas, ambos sabores (EC+ y EC-) produjeron un número comparable de respuestas apetitivas, lo que sugiere que en estas dos condiciones (sacarosa y maltodextrina) se atenuó la valoración hedónica adquirida por el sabor (EC+) proporcionado de forma conjunta con la sacarosa durante el proceso de condicionamiento de la preferencia gustativa.

El análisis estadístico efectuado con las respuestas apetitivas mostradas por los animales durante la prueba de reactividad confirmó la descripción anterior de los resultados. Un ANOVA de medidas repetidas con el Sabor (uva o cereza) y la Solución Devaluada (sacarina, sacarosa o maltodextrina) como factores inter-sujetos, y el tipo

de Exposición a los sabores (mezclado con sacarosa o solo) como factor intra-sujetos, mostró que no hubo efecto de los factores Sabor, tipo de Exposición ni de la interacción [$F_{s(1,26)} \leq 1,658$; $p_s \geq 0,209$], lo que indica que la diferencia en respuestas apetitivas ante los dos sabores, EC+ y EC-, se redujo tras la devaluación. Sin embargo este efecto dependió de la solución devaluada. Un análisis de las comparaciones múltiples con el ajuste de Bonferroni para la interacción Devaluación x Exposición, mostró que no hubo diferencias significativas en cuanto al número de reacciones apetitivas ante los sabores (EC+ y EC-) en las condiciones de devaluación de sacarosa y maltodextrina [$F_s < 1$], pero si existían cuando las solución devaluada fue de sacarina [$F_{(1,26)} = 5,378$; $p = 0,029$].

Figura 13e. Experimento 10: Respuestas apetitivas en la prueba de reactividad

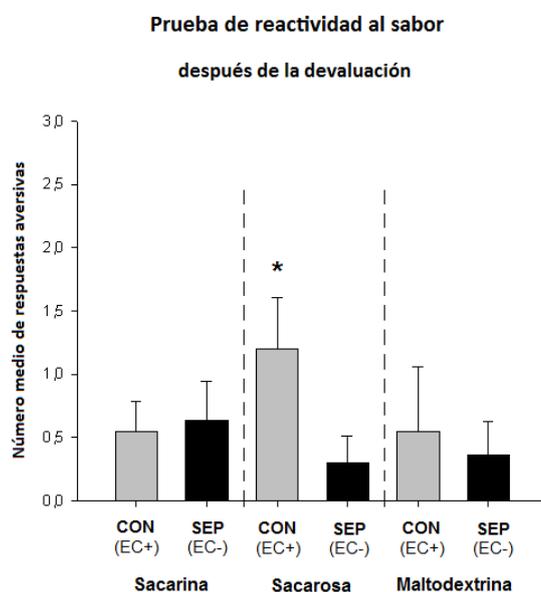


Nota. Duración media (en segundos) de las respuestas apetitivas mostradas por los sujetos en la prueba de reactividad, realizada después de la devaluación, ante la infusión de los sabores CON (EC+): exposición conjunta; y SEP (EC-): exposición separada. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

Respuestas aversivas

Solamente en la condición de devaluación de la sacarosa hubo un número mayor de respuestas aversivas ante la infusión de la solución (EC+) asociada con sacarosa (ver Figura 13f). El ANOVA de medidas repetidas efectuado con estas respuestas mostró que no hubo efecto significativo de los factores Sabor y Exposición o de su interacción [$F_{S(1,26)} \leq 2,547$; $p_s \geq 0,123$], ni tampoco de la Solución Devaluada, de su interacción con los demás factores o la triple interacción entre las variables [$F_{S(2,26)} \leq 1,597$; $p_s \geq 0,222$]. No obstante, un análisis posterior de la interacción Devaluación x Exposición con el ajuste de Bonferroni ($p < 0,05$) reveló una diferencia significativa entre el número de respuestas aversivas mostradas ante los sabores (EC+ y EC-) en la condición de devaluación de la sacarosa, pero no en las condiciones de sacarina y maltodextrina.

Figura 13f. Experimento 10: Respuestas aversivas en la prueba de reactividad



Nota. Número medio de respuestas aversivas mostradas por los sujetos en la prueba de reactividad, realizada después de la devaluación, ante la infusión de los sabores CON (EC+): exposición conjunta; y SEP (EC-): exposición separada. Las barras de error representan el error típico de la media (\pm SEM).

En términos generales, los datos de la prueba de reactividad realizada tras la fase de devaluación reflejan el hecho de que la transferencia de las cualidades hedónicas del EI al EC parece estar más relacionada con el componente nutritivo de la solución reforzante (sacarosa) que con sus propiedades sensoriales (sabor dulce). Además, que la devaluación del EI utilizado para el desarrollo de la preferencia (sacarosa) genere un número mayor de respuestas aversivas es congruente con los experimentos anteriores en los que se incluyó esta manipulación, poniendo de relieve que el valor aversivo adquirido por la sacarosa tras su devaluación se transfiere a la solución con la que se experimentó conjuntamente durante el condicionamiento.

En la Tabla 21e se muestran los valores promedio de las diferentes condiciones de devaluación para las dos categorías de respuestas, apetitivas y aversivas, analizadas en las pruebas de reactividad al sabor llevada a cabo después de la devaluación.

Tabla 21e. Respuestas registradas en la prueba de reactividad tras la devaluación

Grupos de devaluación	Solución	Después de la fase de devaluación	
		Respuestas Apetitivas	Respuestas Aversivas
Sacarina	SEP (EC-)	61,53 ($\pm 6,07$)	0,55 ($\pm 0,24$)
	CON (EC+)	94,12 ($\pm 6,08$)	0,74 ($\pm 0,31$)
Sacarosa	SEP (EC-)	78,08 ($\pm 8,24$)	0,30 ($\pm 0,21$)
	CON (EC+)	78,20 ($\pm 15,35$)	1,30 ($\pm 0,47$)
Maltodextrina	SEP (EC-)	77,13 ($\pm 10,73$)	0,33 ($\pm 0,27$)
	CON (EC+)	76,55 ($\pm 13,45$)	0,55 ($\pm 0,31$)

Nota. Duración media de las respuestas apetitivas (en segundos) y número medio de respuestas aversivas mostradas por los sujetos en la prueba de reactividad, realizada después de la devaluación, ante la infusión de los sabores CON (EC+): exposición conjunta; y SEP (EC-): exposición separada en las tres condiciones de devaluación. Los valores entre paréntesis representan el error típico de la media (\pm SEM).

8.5. Discusión de la serie experimental

Los resultados obtenidos en Experimento 7 indican que la experiencia conjunta de un sabor agradable desde el punto de vista de su palatabilidad (uva o cereza) con la solución de sacarina fue eficaz para promover una fuerte preferencia condicionada por el sabor emparejado con esta solución dulce. Tal y como sucedió en los experimentos anteriores en los que se utilizó sacarina para el desarrollo de una preferencia condicionada por el sabor ácido de limón (Experimentos 1 y 4), tras la fase de condicionamiento se observó un incremento significativo en el consumo de la solución presentada de forma conjunta (EC+) respecto a la solución que se presentó sola (EC-). Conjuntamente estos datos indican que, con independencia del valor hedónico inicial del sabor condicionado, su asociación con las cualidades sensoriales de la sacarina promueve una fuerte preferencia gustativa por esa solución, al menos cuando se estima mediante una prueba de consumo. Por otro lado, confirmando los resultados obtenidos en los estudios anteriores utilizando sacarina como reforzador, la prueba de reactividad realizada en este experimento mostró que el incremento en la preferencia por el sabor presentado de forma conjunta (EC+) con la sacarina durante el condicionamiento no se vio acompañado de un aumento en las respuestas apetitivas que evoca la solución condicionada. Dado que la duración media de las respuestas apetitivas en este experimento fue muy superior en comparación con los experimentos realizados con limón como solución condicionada y sacarina como reforzador (Experimentos 1 y 4), podría pensarse que el valor hedónico inicial apetitivo de las soluciones de uva y cereza pudo influir de algún modo en los resultados de la prueba de reactividad. Sin embargo, el hecho de que no se produjese un cambio en el valor hedónico de la solución asociada con sacarina (EC+) tras el condicionamiento

apoya la propuesta de que las preferencias gustativas establecidas con sacarina responden a la formación de una asociación entre las cualidades sensoriales de la solución condicionada y del reforzador (aprendizaje sabor-sabor). Finalmente, la prueba de extinción mostró que las preferencias condicionadas cuando se utiliza sacarina como reforzador resultan altamente resistentes a los efectos de la experiencia repetida con el sabor condicionado en ausencia del reforzador, un efecto de resistencia a la extinción demostrado de forma repetida durante el aprendizaje de preferencias gustativas con diferentes procedimientos y situaciones experimentales.

Por su parte, los resultados del Experimento 8 indican que la experiencia conjunta de un sabor agradable (uva o cereza) con la solución de sacarosa, de nuevo promovió una fuerte preferencia condicionada por el sabor emparejado con ella (EC+). Tras la fase de condicionamiento se observó un incremento significativo en el consumo de la solución presentada de forma conjunta (EC+) respecto a la solución que se presentó aisladamente (EC-). En la misma línea, la solución presentada de forma conjunta (EC+) también mostró una fuerte preferencia condicionada en aquellos experimentos previos en los que se utilizó sacarosa como EI (Experimentos 2 y 5). Por otra parte, la prueba de reactividad al sabor mostró también que el incremento en la preferencia por el sabor (EC+) presentado de forma conjunta con la sacarosa se acompañó de un aumento en el número de respuestas apetitivas durante la infusión de dicha solución, observándose un número más elevado de respuestas apetitivas respecto a la solución que se presentó sola durante el condicionamiento (EC-). Además, cabe destacar que la duración media de las respuestas apetitivas para el sabor presentado solo (EC-) es muy superior respecto a las obtenidas ante infusiones de ácido cítrico cuando éste se ofreció de forma separada en los Experimentos 2 y 5,

indicando que el valor hedónico inicial de las soluciones de uva y cereza ejerce cierta influencia en los resultados obtenidos en la prueba de reactividad. Sin embargo, ésta técnica parece ser lo suficientemente sensible como para detectar la asociación sabor-nutriente. Finalmente, la prueba adicional de extinción confirmó que el aprendizaje de una preferencia gustativa utilizando sabores apetitivos como EC y sacarosa como EI, se mantiene de forma robusta en el tiempo.

Los resultados del Experimento 9 indican también que la experiencia conjunta de un sabor agradable con la solución de maltodextrina fomentó el desarrollo de una preferencia condicionada por el sabor emparejado con ella, observándose un incremento significativo en el consumo de la solución presentada de forma conjunta (EC+) respecto a la solución proporcionada aisladamente (EC-). Fijándonos en los experimentos previos con maltodextrina, podemos constatar que también se desarrolló una preferencia condicionada por la solución presentada de forma conjunta en los Experimentos 3 y 6. Por otro lado, en la prueba de reactividad al sabor se observa de nuevo un mayor número de respuestas apetitivas en la solución condicionada (EC+), aunque la duración media de las respuestas apetitivas para el sabor presentado solo (EC-) es muy superior respecto a las obtenidas ante la infusión del ácido cítrico proporcionado de forma separada en los Experimentos 3 y 6. Esto destaca la influencia que el valor hedónico inicial de las soluciones ejerce sobre la preferencia, ensombreciendo la expresión de la asociación sabor-nutriente en la prueba de reactividad. Finalmente, la prueba de extinción dejó patente que el uso de un EI sin unas cualidades sensoriales destacadas influye en la robustez del aprendizaje ya que, en términos de consumo, la resistencia a la extinción parece más débil cuando la preferencia se establece únicamente en base a la asociación sabor-nutriente.

Por último, los resultados del Experimento 10 corroboran la efectividad del procedimiento de devaluación del EI para evaluar las bases asociativas del aprendizaje de preferencias gustativas, también mediante la devaluación por separado de cada componente de las asociaciones que se forman al utilizar sacarosa como EI. En este sentido, cuando se realizó la prueba de consumo tras el entrenamiento, se observó el desarrollo de una preferencia condicionada por el sabor (EC+) presentado de forma conjunta con la sacarosa, respecto al sabor presentado solo (EC-). Este efecto de preferencia se vio acompañado, además, de un aumento en el número de reacciones apetitivas mostradas por los animales durante la infusión del sabor condicionado (EC+). Una vez establecida esta preferencia, el cambio en el valor reforzante del componente dulce del sabor del EI (mediante la devaluación de la solución de sacarina) y su transferencia al sabor condicionado se hizo patente en una nueva prueba de consumo, en la cual la preferencia adquirida por la solución condicionada (EC+) se redujo de forma significativa. Por su parte, el cambio en el valor reforzante del componente nutritivo del EI (mediante la devaluación la solución de maltodextrina o de sacarosa) mostró también su efecto sobre la solución condicionada (EC+), en términos de consumo y en una prueba de reactividad posterior a la devaluación. En este sentido, la transferencia de las cualidades hedónicas relacionadas con el poder reforzante del componente calórico del EI hacia la solución con el sabor EC+ se vio afectada cuando en la fase de devaluación del EI existía el componente nutritivo involucrado, pero no cuando la devaluación afectaba solo al componente sensorial y gustativo (sabor dulce). Estos resultados sugieren de nuevo una estrecha relación entre la asociación sabor-cualidades hedónicas y el mecanismo de aprendizaje sabor-nutriente, en lo que a la preferencia condicionada por el sabor se refiere.

De forma conjunta, los resultados de esta última serie experimental ponen de manifiesto la efectividad de la técnica de reactividad al sabor para evaluar las diferentes asociaciones que se forman durante el condicionamiento de preferencia por un sabor, incluso cuando éste es agradable desde un principio. El hecho de que los sabores utilizados para el desarrollo de la preferencia condicionada fuesen apetitivos planteaba la duda acerca de la eficacia de nuestra prueba ya que, al realizar un registro del número de respuestas apetitivas a la solución presentada de forma conjunta (EC+) y a la solución presentada de forma aislada (EC-), la evaluación de los resultados podría verse dificultada por el elevado número de respuestas apetitivas registradas con la solución no condicionada (EC-). Una vez más, la prueba de reactividad al sabor se mostró lo suficientemente sensible como para detectar las diferencias existentes entre ambos sabores en cuanto al patrón de respuestas orofaciales mostradas durante la infusión de estas soluciones, permitiendo establecer así una clara disociación entre los distintos mecanismos de aprendizaje que subyacen al desarrollo de una preferencia condicionada (sabor-sabor y sabor-nutriente) sobre la base de las cualidades hedónicas de las soluciones empleadas y su implicación en los diferentes tipos de asociaciones que se pueden formarse durante el condicionamiento de la preferencia.

Capítulo 9

Discusión general

Los resultados de este estudio muestran que pueden adquirirse, mediante el aprendizaje, preferencias gustativas o condicionadas en virtud de la asociación de sabores inicialmente no preferidos por su baja palatabilidad (como el ácido cítrico) con soluciones que poseen un alto valor reforzante, ya sea debido a sus cualidades sensoriales o gustativas (como el sabor dulce de sacarina y sacarosa), o por las consecuencias post-ingestivas derivadas de sus cualidades nutritivas (sacarosa y maltodextrina). Dada la naturaleza de este tipo de asociaciones, se ha propuesto la explicación de estos patrones conductuales desde el punto de vista del aprendizaje asociativo, entendiendo que los humanos y el resto de animales pueden aprender a aceptar o rechazar determinados alimentos o fluidos en función de las consecuencias de su ingesta o sus cualidades sensoriales (Díaz y De la Casa, 2011; Myers y Sclafani, 2006).

Como se comentó en el capítulo introductorio, el paradigma de aversión condicionada al sabor ha demostrado de forma clara que el emparejamiento de un sabor con el malestar gástrico producido por la inyección de una sustancia con propiedades eméticas o tóxicas (LiCl, por ejemplo) provoca el desarrollo de una aversión condicionada que se manifiesta tanto en el rechazo de la solución gustativa como por las reacciones orofaciales que los sujetos muestran ante su administración forzada con la técnica de reactividad al sabor (Parker, 2003, 2014). Del mismo modo, el desarrollo de preferencias gustativas condicionadas parece basarse también en los mecanismos del aprendizaje asociativo, observando que el emparejamiento repetido de un sabor neutro (o inicialmente no preferido) con sustancias que poseen un sabor dulce o un cierto valor nutritivo incrementa la preferencia por ese sabor.

En las dos primeras series experimentales de este estudio (Capítulos 6 y 7) se ha demostrado el efecto básico de preferencia condicionada por el sabor de una solución de ácido cítrico, determinando la capacidad de diferentes sustancias como sacarina, sacarosa y maltodextrina para promover su adquisición sobre la base a sus cualidades reforzantes. El hecho de utilizar como estímulo condicionado (EC) una solución de ácido cítrico, no preferida inicialmente por su reducida palatabilidad, da mayor consistencia al efecto de preferencia observado (Capaldi y Hunter, 1994; Díaz et al., 2004). En este sentido, los resultados de los experimentos pertenecientes a los capítulos 6 y 7 demuestran el desarrollo de una preferencia condicionada por una solución de limón -en términos de aumento en el consumo de la solución- utilizando como estímulos incondicionados (EI) una solución de sacarina (Experimentos 1 y 4), de sacarosa (Experimentos 2 y 5) o maltodextrina (Experimento 3 y 6). La demostración del condicionamiento de la preferencia gustativa en los experimentos de estos dos capítulos utilizando un grupo control de mera exposición, que establece una reducción de la neofobia y un incremento del consumo de un sabor por su exposición repetida (Domjan, 1976), permitió determinar en qué medida contribuyó este efecto a la preferencia condicionada por el ácido cítrico. De la misma forma, en la tercera serie experimental (Capítulo 8) se demostró de nuevo un efecto de preferencia condicionada por el sabor, pero esta vez utilizando soluciones con sabores inicialmente apetitivos como EC (sabores de uva y cereza). La utilización de sabores apetitivos de forma innata ha sido recurrente en la investigación sobre preferencias condicionadas por el sabor, obteniéndose este efecto en multitud de estudios con diferentes manipulaciones experimentales (Dwyer, 2005; Fedorchak y Bolles, 1987; Pérez, Lucas y Sclafani, 1998, Sclafani y Ackroff, 2015). De igual forma, el desarrollo de las

preferencias condicionadas utilizando sabores apetitivos como EC se llevó a cabo en nuestro estudio utilizando como EI las soluciones de sacarina (Experimento 7), sacarosa (Experimentos 8 y 10) y maltodextrina (Experimento 9).

Existen muchos trabajos en la literatura experimental que han demostrado este efecto de preferencia condicionada por el sabor empleando, al igual que en este estudio, como estímulos incondicionados sustancias dulces sin consecuencias nutritivas como la sacarina (Albertella y Boakes, 2006; Forestell y Lolordo, 2003; Holman, 1975) y soluciones con un alto poder calórico como sacarosa (Capaldi, Hunter y Lyn, 1997) y maltodextrina (Delamater et al., 2006; Dwyer, 2008; Elizalde y Sclafani, 1988). De la misma forma, se han obtenido fuertes preferencias condicionadas con otro tipo de soluciones que también poseen un cierto poder calórico, como glucosa (Boakes y Lubart, 1988; Myers, Ferris y Sclafani, 2005), etanol (Ackroff, Rozental y Sclafani, 2004) o chocolate (Owens et al., 1993). Estos estudios ponen de manifiesto que las preferencias condicionadas por el sabor pueden ser el resultado de una asociación establecida entre los sabores de las sustancias EC y EI (aprendizaje sabor-sabor), pero también pueden ser fruto del desarrollo de una asociación entre el sabor de la sustancia EC y las consecuencias nutritivas o calóricas de la sustancia empleada para producir la preferencia gustativa (aprendizaje sabor-nutriente). Existen determinados procedimientos que permiten disociar estos dos tipos de aprendizaje, como la utilización de sustancias sin componente calórico para fomentar preferencias basadas en asociaciones sabor-sabor (Díaz et al., 2004; Holman, 1975), la manipulación del nivel de privación de los sujetos durante las pruebas para observar el desarrollo de preferencias basadas en asociaciones sabor-nutriente (Capaldi, Owens y Palmer, 1994) y sabor-sabor (Harris, Gorissen, Bailey y Westbrook, 2000) o la utilización de

substancias de un poder nutritivo equivalente pero con diferente palatabilidad y viceversa, con el fin de observar la influencia de ambos tipos de asociación sobre la preferencia condicionada por el sabor (Warwick y Weingarten, 1994).

Teniendo en cuenta los trabajos anteriores, la elección para el presente estudio de sacarina, sacarosa y maltodextrina como soluciones reforzantes, radica en sus distintas propiedades de cara a establecer asociaciones que promuevan el aprendizaje de preferencias gustativas. Por un lado, el desarrollo de una preferencia condicionada utilizando como El una solución dulce y sin valor nutritivo, como sacarina, debería estar basado necesariamente en la asociación sabor-sabor (Holman, 1975). Sin embargo, la utilización de una sustancia con unas cualidades sensoriales específicas (dulzor) y con alto poder nutricional, como la sacarosa, permite el establecimiento tanto de una asociación sabor-sabor como de una asociación sabor-nutriente (Ackroff, 2008; González, García-Burgos, De Brugada y Gil, 2010). Por último, la utilización de una sustancia como maltodextrina, con el mismo poder calórico que la sacarosa pero sin sus cualidades sensoriales (sabor dulce), favorecería la formación de una asociación sabor-nutriente durante el desarrollo de la preferencia condicionada. Algunos estudios han propuesto que la maltodextrina posee un cierto componente de palatabilidad y que tiene un sabor cualitativamente diferente a la sacarosa (Sclafani y Clyne, 1987). Sin embargo, otros autores han demostrado que la maltodextrina no es capaz de desarrollar preferencias condicionadas basadas exclusivamente en su sabor si se minimizan sus efectos post-ingestivos (Bonacchi, Ackroff y Sclafani, 2008; Dwyer, 2008). Por esta razón, el efecto que la maltodextrina puede ejercer como El sobre el desarrollo de la preferencia condicionada estaría más relacionado con el tipo de asociación sabor-nutriente que con el tipo de asociación sabor-sabor.

Explicado esto, en el aprendizaje de las preferencias condicionadas por los sabores se pueden formar asociaciones entre el sabor de la sustancia empleada como EC y las propiedades sensoriales (gustatorias, olfatorias, etc.) y/o motivacionales (componente nutritivo) de la solución reforzante utilizada como EI, pero también entre el sabor de la sustancia EC con las propiedades hedónicas (componente afectivo o emocional) de la sustancia EI (Delamater y Oakeshott, 2007). De hecho, diferentes estudios inciden en la separación de este componente hedónico o afectivo respecto del resto de propiedades susceptibles de asociación que el EI posee (ver revisión de Berridge, 2000). Para evaluar este componente afectivo, la bibliografía nos muestra diferentes técnicas que se han llevado a cabo en el aprendizaje de preferencias gustativas como el análisis de la microestructura del patrón de ingesta (Davis y Smith, 1992; Dwyer, 2008) o la técnica de reactividad al sabor (Grill y Norgren, 1978). Así pues, el uso en este estudio de la técnica de reactividad al sabor para la evaluación del valor hedónico de las sustancias en el condicionamiento de preferencias gustativas nos permitió observar la relación existente entre la asociación sabor-propiedades hedónicas y los diferentes mecanismos de aprendizaje de preferencia propuestos.

Así pues, los resultados derivados de esta prueba fueron claros en nuestro estudio, donde los sujetos de los experimentos en los que la preferencia condicionada por el sabor se desarrolló utilizando sustancias nutritivas como EI (sacarosa en los Experimentos 2, 5, 8 y 10, así como maltodextrina en los Experimentos 3, 6 y 9), mostraron un aumento en el número de respuestas apetitivas durante la infusión de la solución condicionada, un incremento en el valor hedónico del sabor que no se observó en los experimentos donde la preferencia condicionada se había desarrollado con un EI que carecía del componente calórico (sacarina en los Experimentos 1, 4 y 7).

Estos resultados permiten establecer una disociación de los diferentes mecanismos de aprendizaje que subyacen al condicionamiento de preferencias por los sabores (asociaciones sabor-sabor y sabor-nutriente), indicando una estrecha relación entre el componente hedónico y el componente nutricional en este tipo de aprendizaje. Esta relación implica una transferencia de las propiedades hedónicas del EI al EC tan solo cuando el componente nutritivo está implicado en la asociación, independientemente del valor hedónico que la sustancia EC posea de forma innata. Estos resultados son congruentes con los obtenidos en otros trabajos previos mostrando un aumento en la valoración hedónica de sustancias emparejadas con estímulos incondicionados nutritivos, como glucosa (Myers y Sclafani, 2001) o sacarosa (Willmouth y Spear, 2009), un cambio en la cualidad hedónica del sabor que no se produce cuando se utilizan para el aprendizaje de la preferencia estímulos incondicionados sin componente calórico como sacarina (Forestell y Lolordo, 2003). Sin embargo, Myers y Sclafani (2003) no encontraron esta relación entre la magnitud de respuesta hedónicas y el componente nutritivo en otro estudio llevado a cabo con sabores amargos y ácidos como ECs e infusiones de glucosa como EI. Los propios autores ofrecen una explicación de este resultado aludiendo a un cambio en el valor hedónico inicial de los sabores de las soluciones utilizadas en los diferentes experimentos que realizaron y a un cambio en los parámetros de la prueba de reactividad. En su estudio previo utilizaron sabores de uva y cereza como EC (utilizados también en los experimentos del Capítulo 8 de esta tesis, de los que se hablará más adelante) además de infusiones intraorales de 1 minuto durante la prueba. Sin embargo, en el estudio citado de Myers y Sclafani (2003), estos autores utilizaron soluciones con sabores amargo y ácido que se infundían en la cavidad oral de los animales de forma intermitente durante la prueba,

registrando tan solo las reacciones orofaciales de los sujetos durante los primeros 15 segundos de cada minuto en una prueba de 3 minutos de duración. Además, la concentración de ácido cítrico utilizada en los experimentos de los capítulos 6 y 7 de esta tesis (3%) es sensiblemente superior a la utilizada por Myers y Sclafani (0,05%) lo que, sumado a lo anterior, haría difícil una comparación directa de los resultados de ambos estudios. No obstante, diversos factores como la utilización de sustancias con un sabor débil o la infusión excesiva de nutrientes pueden dificultar el desarrollo de la preferencia condicionada por el sabor (Ackroff, 2008). En este sentido, no se descarta la posibilidad de que la concentración utilizada en nuestro estudio fuese más adecuada para evaluar los cambios hedónicos en la prueba de reactividad.

Por otro lado y como indican los resultados de este trabajo, si la transferencia del valor hedónico del EI al EC se produce únicamente cuando el componente nutritivo está presente, el test de reactividad al sabor nos permitiría disociar el aprendizaje de preferencia basado en el sabor y el aprendizaje de preferencia basado en nutrientes. En este sentido, una manipulación específica como la devaluación del EI mediante inyecciones intraperitoneales de cloruro de litio (Experimentos 4, 5 y 6 del Capítulo 7) nos permitió evaluar si ambos mecanismos de aprendizaje responden también a este efecto de forma selectiva. En términos de consumo y de forma general, los resultados de esta serie mostraron un descenso en la preferencia condicionada por una solución cítrica tras la devaluación del reforzador empleado para desarrollar esa preferencia (sacarina, sacarosa o maltodextrina) e independientemente de su valor nutritivo. Este resultado es consistente con muchos estudios en los que el valor reforzante del EI devaluado reside en su valor nutritivo (Baker, Booth, Duggan, y Gibson, 1987; Delamater et al. 2006; Delamater, 2007; Pérez et al., 1996) y también con otros

estudios que han centrado su atención en la devaluación de las propiedades sensoriales de los estímulos incondicionados (Díaz et al, 2004). Así mismo, el análisis del efecto de la devaluación del EI mediante la técnica de reactividad al sabor en nuestro estudio vuelve a poner de manifiesto la disociación existente entre los diferentes mecanismos de aprendizaje de preferencia, sabor-sabor y sabor-nutriente, en función de las cualidades hedónicas de la solución empleada como reforzador. Esta prueba ha permitido comprobar que las diferentes asociaciones formadas durante el condicionamiento de una preferencia gustativa responden de manera selectiva ante el efecto de la devaluación del reforzador. En esta línea, otros trabajos han conseguido disociar también ambos mecanismos de aprendizaje con otros procedimientos de devaluación (Dwyer, 2005; González et al. 2010; Scarlet, Campese y Delamater, 2009). Concretamente en nuestro estudio, la magnitud de las respuestas hedónicas mostradas ante la infusión de una solución de limón tras la devaluación del EI con el que había sido emparejado solo se vio afectada cuando el componente calórico estaba presente en la solución reforzante; esto es, para el caso de usar sacarosa (Experimento 5) y maltodextrina (Experimento 6) como EI, pero no de sacarina (Experimento 4). Estos resultados corroboran que la transferencia de las propiedades hedónicas del EI al EC esta mediada por la asociación sabor-nutriente. Sin embargo, nuestros datos también indican que la transferencia de las propiedades aversivas que pueda tener o adquirir un EI se transfieren al EC independientemente de la naturaleza de su valor reforzante (que puede residir en su sabor agradable o en su valor nutritivo), una cualidad del aprendizaje de elevado valor adaptativo para los animales. Esto se observa en los 3 experimentos del Capítulo 7, tanto en las pruebas de consumo realizadas tras la devaluación del EI, donde la ingesta de la solución condicionada

decrece en todos los casos independientemente del EI utilizado, como en la prueba de reactividad al ácido cítrico tras la devaluación del reforzador, donde los sujetos que recibieron previamente el limón de forma conjunta con el EI mostraron un mayor número de reacciones aversivas respecto al resto de sujetos en cada uno de los experimentos.

Así mismo, los experimentos correspondientes al Capítulo 8 corroboraron también que el efecto de preferencia condicionada por el sabor se produce de igual forma cuando se emplean sabores inicialmente agradables. Para ello, la utilización de saborizantes comerciales (Kool Aid) de uva y cereza como EC permitió establecer preferencias condicionadas por estos sabores, en términos de consumo, cuando eran emparejados tanto con sacarina (Experimento 7) como con sacarosa (Experimento 8) y maltodextrina (Experimento 9). El análisis de las respuestas hedónicas mediante la prueba de reactividad al sabor implicó en esta ocasión la comparación de una solución emparejada con un reforzador (EC+) frente a otra solución que se presentó sola (EC-), que ya de por sí era apetitiva, lo que generaba dudas sobre la sensibilidad de la prueba para evaluar este tipo de sabores. Myers y Sclafani utilizaron en sus estudios de reactividad al sabor la metodología de infusiones intermitentes (Breslin, Davison y Grill, 1990), proporcionando las soluciones a los sujetos únicamente durante los primeros 15 segundos de cada minuto en la prueba. El objetivo era evitar un posible efecto techo debido al sabor de las soluciones pero, observando que sus resultados fueron contradictorios (ver Myers y Sclafani, 2001 y 2003), se optó por mantener en esta serie experimental el mismo criterio que en los experimentos anteriores de esta tesis. Nuevamente, el test de reactividad al sabor demostró su sensibilidad con nuestros parámetros, observando un aumento en el número de reacciones apetitivas

ante los sabores condicionados, pero solo cuando el componente nutritivo formaba parte de las cualidades del EI utilizado para el desarrollo de la preferencia gustativa. Otros trabajos han evaluado también esta disociación con la técnica de reactividad al sabor utilizando sabores apetitivos como EC y un EI con alto valor nutritivo (Forestell y Lolordo, 2003). Para detectar los diferentes mecanismos asociativos variaron el estado motivacional de los sujetos en la prueba, pero los resultados y la conclusión final fueron los mismos que en nuestro caso.

Siguiendo esta línea y para concluir esta serie experimental y el estudio, se llevó a cabo un último experimento con el fin de evaluar, con la técnica de reactividad al sabor, la disociación de ambos mecanismos de aprendizaje (sabor-sabor y sabor-nutriente) en el mismo experimento y una vez establecidas las asociaciones que lo sustentan. Como se ha mencionado anteriormente, la literatura experimental nos ofrece varios trabajos en los que se produce el desarrollo de una preferencia donde se pueden formar durante el entrenamiento ambos tipos de asociaciones, sabor-sabor y sabor-nutriente, y cómo diversas variables como el nivel de motivación o privación de alimento de los animales durante la prueba puede controlar la expresión de uno u otro tipo de mecanismo asociativo (González et al., 2010; Harris et al., 2000; Yiin, Ackroff y Sclafani, 2005a y 2005b). Para formar ambas asociaciones al mismo tiempo, en nuestro experimento se llevó a cabo el desarrollo de una preferencia condicionada por un sabor EC utilizando como EI una solución de sacarosa que posee ambos componentes, sensorial y nutritivo. Una vez desarrollada la preferencia por el sabor asociado a la solución dulce y nutritiva, la devaluación del componente sensorial mediante una inyección de cloruro de litio administrada después de consumir una solución dulce de sacarina trajo como consecuencia un descenso en el consumo de la solución

condicionada previamente con sacarosa como reforzador. Además, se obtuvo el mismo efecto al devaluar una solución de maltodextrina, sin dulzor pero con poder nutritivo, estableciéndose una clara disociación en cuanto a las asociaciones que pueden formarse en el aprendizaje de preferencias condicionadas por los sabores. Respecto a la prueba de reactividad y habiendo comprobado que las propiedades hedónicas del EI solo se transfieren al EC cuando existe un componente nutritivo presente en la asociación, los resultados encontrados confirmaron este efecto: la devaluación exclusiva del componente sensorial del EI (sabor dulce) no reflejó ningún cambio en el patrón de respuestas apetitivas mostrado por los sujetos tras el condicionamiento de la preferencia; por el contrario, la devaluación aislada del componente nutritivo del EI se expresó en un descenso en el número de respuestas apetitivas mostradas por los animales en comparación con las registradas antes de la devaluación tras el condicionamiento con sacarosa. Este efecto se ha demostrado con la técnica de reactividad al sabor en los trabajos de Forestell y Lolordo (2003), pero utilizando un procedimiento basado en el control motivacional. Sin embargo, el uso en nuestro experimento de un procedimiento de devaluación de cada componente del EI por separado y su posterior evaluación con la técnica de reactividad al sabor, hacen de este estudio la primera demostración experimental en lo que a este aspecto se refiere.

Por último y aunque la evaluación del efecto de extinción no fuese un objetivo específico de esta investigación, las pruebas de consumo llevadas a cabo al final de cada experimento pusieron de manifiesto un mayor efecto de resistencia a la extinción cuando el mecanismo de aprendizaje implicado en la preferencia condicionada fue la asociación sabor-sabor que cuando se trataba de una preferencia gustativa basada en la formación de una asociación sabor-nutriente. En contraposición, diversos estudios

indican que las preferencias basadas en asociaciones sabor-nutriente podrían ser más resistentes a la extinción (Albertella y Boakes, 2006; Boakes, Albertella y Harris, 2007; Drucker et al., 1994; Elizalde y Sclafani, 1990). Sin embargo, esta mayor resistencia solo se manifiesta cuando el consumo del sabor asociado con el EI se contrasta con el consumo de otro sabor proporcionado solo durante el condicionamiento, entendiendo esta resistencia a la extinción más por la evitación del sabor no emparejado con el reforzador que por el mantenimiento de la asociación sabor-nutriente (Harris et al., 2004). Este tipo de prueba (EC+ vs. EC-) es el que se ha utilizado en los experimentos de la tercera serie experimental de nuestro estudio (Capítulo 8) y la mayor robustez en cuanto a este efecto de resistencia a la extinción se observó igualmente para la preferencia basada en la asociación sabor-sabor. No obstante, ya que en las pruebas de consumo llevadas a cabo en este capítulo se contrastan dos sabores que son agradables por naturaleza (sabores a uva y cereza), no es de extrañar que el argumento de la evitación del sabor no emparejado carezca de peso cuando los sabores no sean neutros o no preferidos. Además, en las dos primeras series experimentales de este estudio (Capítulos 6 y 7) en las que se emplea un sabor ácido (limón) como EC, la mayor resistencia a la extinción se vuelve a producir en aquellas preferencias que se basan en asociaciones sabor-sabor. Nuevamente, varios estudios han obtenido evidencia de extinción cuando la solución alternativa en un test de dos botellas fue agua (Delamater, 2007; Drucker et al., 1994; Turner et al., 2004), tal y como sucede en las pruebas de consumo que se han llevado a cabo en los experimentos de las dos primeras series experimentales de este trabajo.

En suma, los resultados que se obtuvieron en los estudios que componen esta tesis doctoral demuestran la efectividad de la técnica de reactividad al sabor para la

evaluación de las bases asociativas por las que se rige el aprendizaje de preferencias condicionadas por los sabores. En este sentido, la utilización de esta técnica junto con las pruebas de consumo ha permitido comprobar la existencia de una estrecha relación entre el componente nutritivo del estímulo incondicionado y la asociación sabor-cualidades hedónicas que se puede establecer en el aprendizaje de preferencias gustativas.

Finalmente y a nivel general, cabe destacar que el estudio de las preferencias y aversiones gustativas se ha centrado básicamente en su dimensión teórica, tratando de determinar la naturaleza asociativa de estos procesos de aprendizaje. No obstante, en la última década han surgido orientaciones en la investigación que tratan de incorporar los conocimientos teóricos existentes acerca de esta modalidad de aprendizaje a diversos ámbitos de aplicación tanto en el hombre como en los animales. Se han evaluado, por ejemplo, aspectos relativos a la conducta animal tan diferentes como la influencia de los procesos asociativos que subyacen al desarrollo de las preferencias gustativas para incentivar el consumo de determinadas sustancias, proteicas y nutritivas, en la dieta de los lechones (Figueroa, Solá-Oriol, Borda, Sclafani y Pérez, 2012; Figueroa, Solá-Oriol, Vinokurovas y Pérez, 2013; Guzmán-Pino, Solá-Oriol, Figueroa, Dwyer y Pérez, 2015); la influencia que ejerce el balance nutritivo sobre la conducta de alimentación de las abejas (Simcok, Gray y Wright, 2014), o el análisis de las relaciones existentes entre el comportamiento de la ovejas en campo abierto y la experiencia temprana con dietas diversas y nuevos sabores (Villalba, Catanese, Provenza y Distel, 2012).

En el caso humano, la mayor parte de los trabajos que aplican los conocimientos adquiridos en la investigación básica sobre los mecanismos asociativos del aprendizaje de preferencias por los sabores tienden a promover una alimentación equilibrada y hábitos

alimentarios saludables. En esta línea, son varios los trabajos que ponen de manifiesto la eficacia del aprendizaje sabor-sabor para incentivar el consumo de vegetales en niños (Ahern, Caton, Blundell y Hetherington, 2104; Anzman-Frasca, Savage, Marini, Fisher y Birch, 2012; Capaldi y Wadhera, 2014; Keller, 2014) o del aprendizaje sabor-nutriente para promover la preferencia por determinadas verduras (de Wild, de Graaf y Jager, 2012), así como la influencia de la exposición repetida a los comestibles para aumentar el consumo, como en el caso de los zumos de frutas (Hartvig, Hausner, Wendin, Ritz y Bredie, 2015). Otra implicación práctica que ofrece información sobre los diferentes mecanismos de aprendizaje implicados en las preferencias gustativas iría encaminada al diseño de técnicas de intervención psicológica para el tratamiento de patologías relacionadas con la conducta alimentaria. En este sentido, algunas investigaciones ya se han centrado en la aplicación de los principios del condicionamiento clásico al tratamiento de problemas relacionados con la obesidad (Birch y Anzman-Frasca, 2011; Davidson, Sample y Swithers, 2014).

No obstante, se hace necesario fomentar la investigación en esta línea para tener una visión más holística y disponer de herramientas para llevar a la práctica los conocimientos teóricos. De esta forma, las campañas encaminadas a mejorar los hábitos alimentarios podrían, además de informar, mejorar los patrones conductuales en pos de lograr unas preferencias alimentarias sanas no solo porque en nuestra sociedad actual el consumo de sustancias “bajas en calorías” se ha convertido en la tendencia de los patrones de alimentación, sino también por la consecuente reducción del gasto en sanidad que esto supondría.

Capítulo 10

Conclusiones

Conclusiones

En esta tesis doctoral se han evaluado los cambios hedónicos producidos en la valoración afectiva de los fluidos mediante un paradigma de preferencia condicionada por el sabor, obteniendo las siguientes conclusiones en relación con las hipótesis planteadas y los objetivos específicos del trabajo:

1) La combinación de un sabor de baja palatabilidad (ácido cítrico) con sustancias que poseen diferentes cualidades reforzantes (sacarina, sacarosa y maltodextrina) resulta en el desarrollo de una preferencia condicionada por ese sabor en términos de consumo de la solución, lo que permite disociar los diferentes mecanismos asociativos por los que se rige la adquisición de las preferencias gustativas (sabor-sabor y sabor-nutriente).

2) La transferencia de las propiedades hedónicas de la sustancia reforzante al sabor condicionado, evaluada mediante la prueba de reactividad al sabor, está mediada por la presencia del componente nutritivo en la solución reforzante. Este efecto se manifiesta en un incremento de las respuestas apetitivas ante la solución condicionada.

3) El efecto de la devaluación del reforzador mediante el cloruro de litio se transfiere a la solución condicionada produciéndose un incremento de sus propiedades aversivas además de una disminución de la preferencia por ese sabor en términos de consumo, un efecto que no depende de la naturaleza reforzante (cualidades sensoriales o nutritivas) de la solución devaluada.

Conclusiones

4) Las propiedades aversivas adquiridas por una solución reforzante tras su devaluación afectan de forma selectiva a la valoración hedónica de la solución condicionada, produciéndose una disminución de la misma únicamente cuando el componente calórico está implicado en la asociación establecida.

5) La utilización de soluciones gustativas con un valor hedónico inicial positivo como estímulos condicionados en el desarrollo de la preferencia responde a los mismos principios asociativos que las preferencias condicionadas por sabores no preferidos inicialmente, expresándose de igual forma en términos de consumo y en la valoración hedónica de la solución en términos de reactividad.

6) La técnica de reactividad al sabor se muestra eficaz no solo para la evaluación de la valoración afectiva de las soluciones implicadas en el desarrollo de las preferencias gustativas sino también para la evaluación de las bases asociativas por las que se rige el aprendizaje de preferencias por los sabores.

Conclusions

In the present study using the taste reactivity methodology, preferences and palatability changes were analysed to investigate associative mechanisms underlying flavour preference learning. The results obtained can be summarized in the following points:

- 1) When an aversive CS flavour (lemon solution) was paired with either the sweet taste of saccharin or the postingestive nutrient effects of sucrose or maltodextrin, each of the solutions caused an increase in flavour consumption, indicating the development of conditioned flavour preference for the associated CS flavor.
- 2) Unlike saccharin, sucrose and maltodextrin each caused a significant increase in the palatability of the associated CS flavour, as assessed by the number of appetitive responses in the taste reactivity test. This finding suggests that hedonic shifts in flavour preference learning are mediated by an association between the CS flavour and the postingestive effects of nutrients.
- 3) Following pairing of saccharin, sucrose or maltodextrin with lithium-induced illness, a significant decrease in flavour intake was obtained, indicating that the previously conditioned flavour preference was abolished by the reinforcer devaluation procedure.

Conclusiones

4) We found that the devaluation of sucrose and maltodextrin, but not of saccharin, caused a reduction in the palatability of the associated CS flavor and a concomitant increase in the number of aversive reactions, a result suggesting that learned changes in perceived palatability are mediated by a flavour-nutrient association.

5) Following pairing of an appetitive CS flavour (grape or cherry) with saccharin sucrose or maltodextrin, a significant increase in flavour intake as well as an increase in the number of appetitive reactions were observed, a pattern identical to that found with an aversive CS flavour.

6) Finally, the taste reactivity test results a suitable methodology to assess hedonic shifts during the development of conditioned flavour preferences and examine the associative basis of this learning phenomena.

Referencias

- Ackroff, K. (2008). Learned flavor preferences. The variable potency of post-oral nutrient reinforcers. *Appetite*, *51*, 743–746.
- Ackroff, K., Dym, C., Yiin, Y. M. y Sclafani, A. (2009). Rapid acquisition of conditioned flavor preferences in rats. *Physiology & Behavior*, *97*, 406-413.
- Ackroff, K., Lucas, F. y Sclafani, A. (2005). Flavor preference conditioning as a function of fat source. *Physiology & Behavior*, *85*, 448-460.
- Ackroff, K., Rozental, D. y Sclafani, A. (2004). Ethanol-conditioned flavor preferences compared with sugar- and fat-conditioned preferences in rats. *Physiology & Behavior*, *81*, 699– 713.
- Ackroff, K., Yiin, Y. M. y Sclafani, A. (2010). Post-oral infusion sites that support glucose-conditioned flavor preferences in rats. *Physiology & Behavior*, *99*, 402-411.
- Ahern, S. M., Caton, S. J., Blundell, P. y Hetherington, M. M. (2014). The root of the problem: increasing root vegetable intake in preschool children by repeated exposure and flavour learning. *Appetite*, *80*, 154-160.
- Albertella, L. y Boakes, R. A. (2006). Persistence of conditioned flavor preferences is not due to inadvertent food reinforcement. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *32*, 386-395.
- Anzman-Frasca, S., Savage, J. S., Marini, M. E., Fisher, J. O. y Birch, L. L. (2012). Repeated exposure and associative conditioning promote preschool children's liking of vegetables. *Appetite*, *58*, 543-553.
- Baeyens, F., Eelen, P., Van den Bergh, O. y Crombez, G. (1992). The content of learning in human evaluative conditioning: Acquired valence is sensitive to US-Revaluation. *Learning and Motivation*, *23*, 200-224.

Referencias

- Baker, B. J., Booth, D. A., Duggan, J. P. y Gibson, E. L., (1987). Protein appetite demonstrated: Learned specificity of protein-cue preference to protein need in adult rats. *Nutrition Research*, 7, 481–487.
- Bayés, R. (1983). Preferencias y aversiones alimenticias en una población española. *Revista de Psicología General y Aplicada*, 38, 513-528.
- Bellisle, F., Laffort, P. y Köster, E. (2003). Jacques Le Magnen (1916-2002). *Chemical Senses*, 28 (2), 85-86.
- Bernstein, I. L. (1978). Learned taste aversions in children receiving chemotherapy. *Science*, 200, 1302-1303.
- Bernstein, I. L. y Courtney, L. (1987). Salt preferences in the preweanling rat. *Developmental Psychobiology*, 20, 443-453.
- Berridge, K. C. (2000). Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24, 173-198.
- Berridge, K. C. y Grill, H. J. (1983). Alternating ingestive and aversive consummatory responses suggest a two-dimensional analysis of palatability in rats. *Behavioral Neuroscience*, 97, 563-573.
- Berridge, K. C. y Grill, H. J. (1984). Isohedonic tastes support a two-dimensional hypothesis of palatability. *Appetite*, 5, 221-231.
- Bilkó, A., Altbacker, V. y Hudson, R. (1994). Transmission of food preference in the rabbit: the means of information transfer. *Physiology & Behavior*, 56, 907-912.
- Birch, L. L. y Anzman-Frasca, S. (2011). Promoting children's healthy eating in obesogenic environments: Lessons learned from the rat. *Physiology & Behavior* 104, 641-645.

- Birch, L. L. (1999). Development of food preferences. *Annual Review of Nutrition*, 19, 41-62.
- Birch, L. L. y Fisher, J. A. (1996). The role of experience in the development of children's eating behavior. In Capaldi E. D. (Ed.), *Why we eat what we eat: The Psychology of Eating* (pp. 113-145). Washington, DC: American Psychological Association.
- Birch, L. L., Gunder, L., Grimm-Thomas, K. y Laing, D. G. (1998). Infants' consumption of a new food enhances acceptance of similar foods. *Appetite*, 30(3), 283-295.
- Boakes, R. A., Albertella, L. y Harris, J. H. (2007). Expression of flavor preference depends on type of test and on recent drinking history. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 33(3), 327-338
- Boakes, R. A. y Lubart, T. (1988). Enhanced preference for a flavour following reversed flavour-glucose pairing. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 40B, 49-62.
- Boakes, R. A., Rossi-Arnaud, C. y Garcia-Hoz, V. (1987). Early experience and reinforcer quality in delayed flavour-food learning in the rat. *Appetite*, 9, 191-206.
- Bolles, R. C. (1961). The interaction of hunger and thirst in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 54, 580-584.
- Bolles, R. C., Hayward, L. y Crandall, C. (1981). Conditioned taste preferences based on caloric density. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 7, 59-69.
- Bonacchi, K. B., Ackroff, K. y Sclafani, A. (2008) Sucrose taste but not polyose taste conditions flavor preferences in rats. *Physiology & Behavior*, 95, 235-244.
- Breslin, P. A., Davidson, T. L. y Grill, H. J. (1990). Conditioned reversal of reactions to normally avoided tastes. *Physiology & Behavior*. 47, 535-538.

- Bures, J., Bermudez-Rattoni, F. y Yamamoto, T. (1998). *Conditioned taste aversion: Memory of a special kind*. Oxford: Oxford University Press.
- Capaldi, E. D. (1996). Conditioned food preferences. In Capaldi, E. D. (Ed.), *Why We Eat What We Eat: The Psychology of Eating* (pp. 53-82). Washington, DC: American Psychological Association.
- Capaldi, E. D., Campbell, D. H., Sheffer, J. D. y Bradford, J. P. (1987). Conditioned flavor preferences based on delayed caloric consequences. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 13, 150-155.
- Capaldi, E. D., Myers, D. E., Campbell, D. H. y Sheffer, J. D. (1983). Conditioned flavor preferences based on hunger level during original taste exposure. *Animal Learning & Behavior*, 11, 107-115.
- Capaldi, E. D. y Hunter, M.J. (1994). Taste and odor in conditioned flavor preference learning. *Animal Learning & Behavior*, 22, 355-365.
- Capaldi, E. D., Hunter, M.J. y Lyn, S.A. (1997). Conditioning with taste as the CS in conditioned flavor preference learning. *Animal Learning & Behavior*, 25, 427-436.
- Capaldi, E. D., Owens, J. y Palmer, K. A. (1994). Effects of food deprivation on learning and expression of flavor preferences conditioned by saccharin or sucrose. *Animal Learning & Behavior*, 22(2), 173-180.
- Capaldi, E. D. y Wadhwa, D. (2014). Associative conditioning can increase liking for and consumption of brussels sprouts in children aged 3 to 5 years. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114, 1236-1241.

Referencias

- Colwill, R. M. y Rescorla, R. A. (1985). Instrumental responding remains sensitive to reinforcer devaluation after extensive training. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *11*, 520-536.
- Capaldi, E. D. y Sheffer, J. D. (1992). Contrast and reinforcement in consumption. *Learning and Motivation*, *23*, 63-79.
- Davidson, T. L. (1998). Hunger cues as modulatory stimuli. In Schmajuk, N. A. & Holland, P. C. (Eds.), *Occasion setting: Associative learning and cognition in animals* (pp. 238-248). Washington, DC: American Psychological Association.
- Davidson, T. L., Sample, C. H. y Swithers, S. E. (2014). An application of Pavlovian principles to the problems of obesity and cognitive decline. *Neurobiology of Learning and Memory*, *108*, 172-184.
- Davis, J. D. (1989). The microstructure of ingestive behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *575*, 39-45.
- Davis, J. D. y Smith, G. P. (1992). Analysis of the microstructure of the rhythmic tongue movements of rats ingesting maltose and sucrose solutions. *Behavioral Neuroscience*, *106*, 217-228.
- De Wild, V. W. T., De Graaf, C. y Jager, G. (2013). Effectiveness of flavour nutrient learning and mere exposure as mechanisms to increase toddler's intake and preference for green vegetables. *Appetite*, *64*, 89-96.
- Delamater, A. R. (2007). Extinction of conditioned flavor preferences. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *33*, 160-171.
- Delamater, A. R. (2011). Partial reinforcement and latent inhibition effects on stimulus-outcome associations in flavor preference conditioning. *Learning & Behavior*, *39*(3), 259-270.

- Delamater, A. R. (2012). Issues in the extinction of specific stimulus-outcome associations in Pavlovian conditioning. *Behavioural Processes*, *90*, 9-19.
- Delamater, A. R., Campese, V., LoLordo, V. M. y Sclafani, A. (2006). Unconditioned stimulus devaluation effects in nutrient conditioned flavor preferences. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *32*, 295-306.
- Delamater, A. R. y Oakeshott, S. (2007). Learning about multiple attributes of reward in pavlovian conditioning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1104*, 1-20.
- Deutsch, J. A., Molina, F. y Puerto, A. (1976). Conditioned taste aversion caused by palatable nontoxic nutrients. *Behavioral Biology*, *16*, 161-174.
- Díaz, E. y De la Casa, L. G. (2011). Extinction, spontaneous recovery and renewal of flavor preferences based on taste-taste learning. *Learning & Motivation*, *42*, 64-75.
- Díaz, E., De la Casa, L. G., Ruiz, G. y Baeyens, F. (2004). Aprendizaje sabor-sabor en la adquisición de preferencias gustativas. *Psicológica*, *25*, 135-146.
- Diaz-Cenzano, E. y Chotro, M. G. (2010). Prenatal binge ethanol exposure on gestation days 19-20, but not on days 17-18, increases postnatal ethanol acceptance in rats. *Behavioral Neuroscience*. *124*(3), 362-369.
- Domjan, M. (1976). Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *2*, 17-27.
- Domjan, M. (2009). *Principles of learning and behavior*. (6th Ed.) Belmont, CA: Wadsworth/Cengage.

Referencias

- Drucker, D. B., Ackroff, K. y Sclafani, A. (1994). Nutrient-conditioned flavor preference and acceptance in rats: Effects of deprivation state and nonreinforcement. *Physiology & Behavior, 56*, 701-707.
- Drucker, D. B. y Sclafani, A. (1997). The role of gastric and postgastric sites in glucose-conditioned flavor preferences in rats. *Physiology & Behavior, 61*, 351-358.
- Dwyer, D. M. (2005). Reinforcer devaluation in palatability-based learned flavor preferences. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, 31*, 487-92.
- Dwyer, D. M. (2008). Microstructural analysis of conditioned and unconditioned responses to maltodextrin. *Learning & Behavior, 36*, 149-158.
- Dwyer, D. M. (2012). Licking and liking: The assessment of hedonic responses in rodents. *Quarterly Journal of Experimental Psychology, 65*, 371-394.
- Dwyer, D. M., Boakes, R. A. y Hayward, A. J. (2008). Reduced palatability in lithium- and activity-based, but not in amphetamine-based, taste aversion learning. *Behavioral Neuroscience, 122*, 1051-1060.
- Elizalde, G. y Sclafani, A. (1988). Starch-based conditioned flavor preferences in rats: influence of taste, calories and CS-US delay. *Appetite, 16*, 161-174.
- Elizalde, G. y Sclafani, A. (1990). Flavor preferences conditioned by intragastric Polycose infusions: A detailed analysis using an electronic esophagus preparation. *Physiology & Behavior, 47*, 63-77.
- Fanselow, M. S. y Birk, J. (1982). Flavor-flavor associations induce hedonic shifts in taste preference. *Animal Learning & Behavior, 10*, 223-228.

- Fedorchak, P. M. y Bolles, R. C. (1987). Hunger enhances the expression of caloric- but not taste-mediated conditioned flavor preferences. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 13, 73-79.
- Figuroa, J., Solà-Oriol, D., Borda, E., Sclafani, A. y Pérez, J. F. (2012). Flavour preferences conditioned by protein solutions in post-weaning pigs. *Physiology & Behavior*, 107, 309-316.
- Figuroa, J., Solà-Oriol, D., Vinokurovas, L., Manteca, X. y Pérez, J. F. (2013). Prenatal flavour exposure through maternal diets influences. *Animal Feed Science and Technology*, 183, 160-167.
- flavour preference in piglets before and after weaning
- Flynn, F. W., Schukkin, J. y Havens, M. (1993). Sex differences in salt preferences and taste reactivity in rats. *Brain Research Bulletin*, 32(2), 91-95.
- Forestell, C. A. y LoLordo, V. M. (2003). Palatability shifts in taste and flavour preference conditioning. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 56B, 140-160.
- Freeman, K. B. y Riley, A. L. (2009). The origins of conditioned taste aversion learning: a historical analysis. In Reilly, S. & Schachtman, T. R. (Eds.), *Conditioned taste aversion: Behavioral and neural processes* (pp. 9-33). New York, NY: Oxford University Press.
- Galef, B. G. (1996). Social influences on food preferences and feeding behavior vertebrates. In Capaldi, E. D. (Ed.), *Why we eat what we eat: The Psychology of Eating* (pp. 207-233). Washington, DC: American Psychological Association.

- García, J. (1989). Food for Tolman: Cognition and cathexis in concert. In T. Archer & L.G. Nilsson (Eds.), *Aversion, Avoidance, and Anxiety: Perspectives on Aversively Motivated Behavior* (pp. 45-85). Hillsdale, NJ: Lawrence Earlbaum.
- García, E. y Bach, L. (1999). Preferencias y aversiones alimentarias. *Anuario de Psicología*, 30(2), 55-77.
- García, J., Kimmeldorf, D. J. y Koelling, R. A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122, 157-158.
- García, J. y Koelling, R. A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*, 4, 123-124.
- García, J., Lasiter, P. S., Bermúdez-Rattoni, F. y Deems, D. A. (1985). A general theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443, 54-66.
- González, F., Garcia-Burgos, D., Brugada, I. y Gil, M. (2010): Learned preference for a hedonically negative flavor is observed after pairings with positive post-ingestion consequences rather than with a palatable flavor. *Learning and Motivation*, 41, 141-149.
- Grill, H. C. (1985). Physiological mechanism in conditioned taste aversions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443, 67-88.
- Grill, H. J. y Norgren, R. (1978). The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Research*, 143, 263-279.
- Guzmán-Pino, S. A., Solà-Oriol, D., Figueroa, J., Dwyer, D. M. y Pérez, J. F. (2015). Effect of a long-term exposure to concentrated sucrose and maltodextrina solutions on the preference, appetite, feed intake and growth performance of post-weaned piglets. *Physiology & Behavior*, 141, 85-91.

- Hall, W. G. y Bryan, T. E. (1981). The ontogeny of feeding in rats: IV. Taste development as measured by intake and behavioral responses to oral infusions of sucrose and quinine. *Journal of Comparative and Physiological Psychology, 95*, 240-251.
- Harris, J. A., Gorissen, M. C., Bailey, G.K. y Westbrook, R. F. (2000). Motivational state regulates the content of learned flavor preferences. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, 26*, 15–30.
- Harris, J. A., Shand, F. L., Carroll, L. Q. y Westbrook, R. F. (2004). Persistence of preference for a flavor presented in simultaneous compound with sucrose. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, 30*, 177-189.
- Hartvig, D. L., Hausner, H., Wendin, K., Ritz, C. y Bredie, W. L. P. (2015). Initial liking influences the development of acceptance learning across repeated exposure to fruit juices in 9–11 year-old children. *Food Quality and Preference 39*, 228-235.
- Havermans, R. C. y Jansen, A. (2007). Increasing children's liking of vegetables through flavour–flavour learning. *Appetite, 48*, 259-262.
- Hill, D. L. y Mistretta, C. M. (1990). Developmental neurobiology of salt taste sensations. *Trends in Neuroscience, 13*, 188-195.
- Hill, D. L. y Prezekop, O. R. (1988). Influences of dietary sodium on functional taste receptor development: a sensitive period. *Science, 241*, 1826-1828.
- Holman, E. W. (1975). Immediate and delayed reinforcers for flavor preferences in rats. *Learning and Motivation, 6*, 91-100.
- Hunt, P. S., Kraebel, K. S., Rabine, H., Spear, L. P. y Spear, N. E. (1993). Enhanced ethanol intake in preweanling rats following exposure to ethanol in a nursing context. *Developmental Psychobiology, 26*, 133-153.

- Jankunis, E. S. y Whishaw, I. Q. (2013). Sucrose Bobs and Quinine Gapes: Horse (*Equus caballus*) responses taste support phylogenetic similarity in taste reativity. *Behavioural Brain Research*, 256, 284-290.
- Keller, K. L. (2014). The use of repeated exposure and associative conditioning to increase vegetable acceptance in children: explaining the variability across studies. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114, 1169-1173.
- Klosterhalfen, S. y Klosterhalfen, W. (1985). Conditioned taste aversion and traditional learning. *Psychological Research*, 47, 71-94.
- Konorski, J. (1967). *Integrative activity of the brain: an interdisciplinary approach*. Chicago: University of Chicago Press.
- Lavin, M. J. (1976). The establishment of flavor-flavor associations using a sensory preconditioning training procedure. *Learning & Motivation*, 7, 173-183.
- Lin, J-Y., Arthurs, J. y Reilly, S. (2014). Conditioned taste aversion, drugs of abuse and palatability. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 45, 28-45.
- Logue, A. W. (1985). Conditioned food aversion learning in humans. In Braveman, N. S. & Brostein, P. (Eds.), *Experimental assessment and clinical applications of conditioned food aversions* (pp. 316-329). Annals of the New York Academy of Sciences.
- Lyn, S. A. y Capaldi, E. D. (1994). Robust conditioned flavor preferences with a sensory preconditioning procedure. *Psychonomic Bulletin and Review*, 1, 491-493.
- Mehiel, R. y Bolles. R. C. (1988). Learned flavor preferences based on calories are independent of initial hedonic value. *Animal Learning & Behavior*, 16, 383-387.

Referencias

- Mennella, J. A. y Beauchamp, G. K. (1996). The early development of human flavor preferences. In Capaldi, E. D. (Ed.), *Why we eat what we eat: The Psychology of Eating* (pp. 83-113). Washington, DC: American Psychological Association.
- Myers, K. P. (2007). Robust preference for a flavor paired with intragastric glucose acquired in a single trial. *Appetite*, *48*, 123-127.
- Myers, K.P., Ferris, J., & Sclafani, A. (2005). Flavor preferences conditioned by postingestive effects of nutrients in preweanling rats. *Physiology & Behavior*, *84*(3), 407-419.
- Myers, K. P. y Sclafani, A. (2001). Conditioned enhancement of flavor evaluation reinforced by intragastric glucose: II. Taste reactivity analysis. *Physiology & Behavior*, *74*(4), 495-505.
- Myers, K. P. y Sclafani, A. (2003). Conditioned acceptance and preference but not altered taste reactivity responses to bitter and sour flavors paired with intragastric glucose infusion. *Physiology & Behavior*, *78*, 173-183.
- Myers, K. P. y Sclafani, A. (2006). Development of learned flavor preferences. *Developmental Psychobiology*, *48*, 380-388.
- Owens, J., Capaldi, E. D. y Sheffer, J. D. (1993). An exposure effect opposes flavor-nutrient learning. *Animal Learning & Behavior*, *21*, 196-202.
- Parker, L. A. (1980). Conditioned suppression of drinking: a measure of the CR elicited by a lithium-conditioned flavor. *Learning and Motivation*, *11*, 538-559.
- Parker, L. A. (1982). Nonconsummatory and consummatory behavioral CRs elicited by lithium- and amphetamine-paired flavors. *Learning and Motivation*, *13*, 281-303.

Referencias

- Parker, L. A. (1995). Rewarding drugs produced taste avoidance, but not taste aversion. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19, 143-151.
- Parker, L. A. (2003). Taste avoidance and taste aversion: Evidence for two different processes. *Learning & Behavior*, 31(2), 165-172.
- Parker, L.A. (2014). Conditioned flavor avoidance and conditioned gaping: Rat models of conditioned nausea. *European Journal of Pharmacology*, 722, 122-133.
- Parker, L. A., Limebeer, C. L. y Rana, S. A. (2009). Conditioned disgust, but not conditioned taste avoidance, may reflect conditioned nausea in rats. In Reilly, S. & Schachtman, T. R. (Eds.), *Conditioned taste aversion: Behavioral and neural processes* (pp. 92-113). New York, NY: Oxford University Press.
- Pelchat, M. L., Grill, H. J., Rozin, P. y Jacobs, J. (1983). Quality of acquired responses to tastes by *Rattus norvegicus* depends on type of associated discomfort. *Journal of Comparative Psychology*, 97, 140-153.
- Pérez, C., Lucas, F. y Sclafani, A. (1995). Carbohydrate, fat, and protein condition similar flavour preferences in rats using an oral delay procedure. *Physiology & Behavior*, 57, 549-554.
- Pérez, C., Lucas, F. y Sclafani, A. (1998). Increased flavor acceptance and preference conditioned by postingestive actions of glucose. *Physiology & Behavior*, 64(4), 483-492
- Reilly, S. y Schachtman, T. R. (2009). *Conditioned Taste aversion: Behavioral and neural processes*. New York, NY: Oxford University Press.
- Richter, C. P. y Campbell, K. H. (1939). Sucrose taste thresholds of rats and humans. *American Journal of Physiology*, 128, 291-297.

- Rozin, P. y Schulkin, J. (1990). Food selection. In Stricker, E. M. (Ed.), *Handbook of behavioral neurobiology: Neurobiology of food and fluid* (pp. 297-328). New York, NY: Plenum Press.
- Rozin, P. (1980). Human food selection: Why do we know so little and what can we do about it? *International Journal of Obesity*, 4, 333-337.
- Rozin, P. (1996). Sociocultural influences on human food selection. In Capaldi, E. D. (Ed.), *Why we eat what we eat: The Psychology of Eating* (pp. 233-267). Washington, DC: American Psychological Association.
- Rozin, P. (2007). Food and eating. In Kitayama, S. & Cohen, D. (Eds.), *Handbook of Cultural Psychology* (pp. 391-416). New York: Guilford.
- Rozin, P. y Zellner, D. (1985). The role of Pavlovian conditioning in the acquisition of food likes and dislikes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443, 189-202.
- Rzóska, J. (1954). Bait shyness, a study in rat behavior. *British Journal of Animal Behaviour*, 1, 128-135.
- Sahley, C., Rudy, J. W. y Gelperin, A. (1981). Analysis of associative learning in a terrestrial mollusc *Limax Maximus*. II. Appetitive learning. *Journal of Comparative Physiology*, 144, 1-8.
- Scarlet, J., Campese, V. y Delamater, A.R. (2009). Sensory-specific in flavor-preference reversal learning. *Learning & Behavior*, 37, 179-187.
- Schafe, G. E. y Bernstein, I. L. (1996). Forebrain contributions to the induction of brainstem correlate of conditioned taste aversion: I. The amygdala. *Brain Research*, 741, 109-116.

- Schafe, G. E., Sollars, S. I. y Bernstein, I. L. (1995). The CS-US interval in taste aversion learning: A brief look. *Behavioral Neuroscience*, *109*, 799-802.
- Sclafani, A. (1990). Nutritionally based learned flavor preferences in rats. In Capaldi, E. D. & Powley, T. L. (Eds.), *Taste, experience and feeding* (pp. 139-156). Washington, DC: American Psychological Association.
- Sclafani, A. (1999). Macronutrient-conditioned flavor preferences. In Berthoud, H. R. & Seeley, R. J. (Eds.), *Neural control of macronutrient selection* (pp. 93-106). Boca Raton: CRC Press.
- Sclafani, A. y Ackroff, K. (2015). Flavor preference conditioning by different sugars in sweet ageusic *Trom5* Knockout mice. *Physiology & Behavior*, *140*, 156-163.
- Sclafani, A. y Clyne, A. (1987). Hedonic response of rats to polysaccharide and sugar solutions. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *11*, 173-180.
- Simcock, N. K., Gray, H. E. y Wright, G. E. (2014). Single amino acids in sucrose rewards modulate feeding and associative learning in the honeybee. *Journal of Insect Physiology*, *69*, 41-48.
- Simmen, B., Pasquet, P. y Hladik, C. M. (2004). Methods for assessing taste abilities and hedonic responses in human and non-human primates. In Macbeth, H. & MacClancy, J. (Eds.) *Researching Food Habits: Methods and Problems* (pp. 87-99). Berghahn Books, Oxford.
- Steiner, J. E., Glaser, D., Hawilo, M. E. y Berrigde, K. C. (2001). Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *25*, 53-74.
- Turner, N., Frieman, J. y Mehiel, R. (2004). Extinction and spontaneous recovery of a conditioned flavor preference. *Learning and Motivation*, *35*, 83-101.

- Tordoff, M. G. y Friedman, M. I. (1986). Hepatic portal glucose infusions decrease food intake and increase food preference. *American Journal of Physiology*, 251, R192-R196.
- Tordoff M. G. y Bachmanov A. A. (2003). Mouse Taste Preference Tests: Why Only Two Bottles? *Chemical Senses*, 27, 759-768.
- Torquet, N., Aimé, P., Messaoudi, B., García, S., Ey, E., Gervais, R., Julliard, A. K. y Ravel, N. (2014). Olfactory preference conditioning changes the reward value of reinforced and non-reinforced odors. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 229.
- Van des Bos, R., Meijer, M. K. y Spruijt, B. M. (2000). Taste reactivity patterns in domestic cats (*Felis silvestris catus*). *Applied Animal Behaviour Science*, 69, 149-168.
- Verendeev, A. y Riley, A. L. (2012). Conditioned taste aversion and drugs of abuse: history and interpretation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(10), 20193-20205.
- Villalba, J. J., Catanese, F., Provenza, F. D. y Distel, R. A. (2012). Relationships between early experience to dietary diversity, acceptance of novel flavors, and open field behavior in sheep. *Physiology & Behavior*, 105, 181-187
- Warwick, Z. S. y Weingarten, H. P. (1994). Dissociation of palatability and calorie effects in learned flavor preferences. *Physiology & Behavior*, 55(3), 501-504.
- Wilmouth, C. E. y Spear, L. P. (2009). Hedonic sensitivity in adolescent and adult rats: taste reactivity and voluntary sucrose consumption. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92, 566-573

Referencias

- Yiin, Y.M., Ackroff, K. y Sclafani, A. (2005a). Food deprivation enhances the expression but not acquisition of flavor acceptance conditioning in rats. *Appetite*, 45, 152-160.
- Yiin, Y. M., Ackroff, K. y Sclafani, A. (2005b). Flavor preferences conditioned by intragastric nutrient infusions in food restricted and free-feeding rats. *Physiology & Behavior*, 84, 217-231
- Zajonc, R. B. (1968). Attitudinal effects of mere exposure. *Journal of Personality and Social Psychology*, 9(2), 1-27.
- Zellner, D. A., Rozin, P., Aron, M. y Kulish, C. (1983). Conditioned enhancement of human's liking for flavors associated with sweetness. *Learning and Motivation*, 14, 338-350.

