



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Participación de las cortezas prefrontales
en la toma de decisiones guiada por una memoria gustativa

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ana Paulina De las Peñas Rincón

Dr. Francisco Sotres Bayón
Instituto de Fisiología Celular
UNAM

Dra. Clorinda Arias; Dr. Ranier Gutiérrez
Instituto de Ciencias Biomédicas, UNAM; CINVESTAV, IPN

Ciudad de México. Marzo, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo No. 176639 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por los donativos No. IA2020313 y No. IA 200715 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM) y por el programa “IBRO Return Home Program 2012”

Contenido

Agradecimientos.....	3
Resumen	4
Introducción	6
Procesamiento de un estímulo gustativo.....	7
Procesamiento cortical de un estímulo gustativo	8
La corteza insular	8
La corteza medial prefrontal	9
La corteza orbitofrontal.....	10
Procesamiento cortical de la toma de decisiones	11
La corteza prefrontal e insular en la toma de decisiones.....	11
Antecedentes.....	12
El modelo conductual.....	12
Planteamiento del problema.....	13
Pregunta de investigación	14
Hipótesis	14
Objetivos:.....	14
Métodos	15
Sujetos experimentales	15
Cirugía.....	15
Conducta.....	16
CAS sin opción	17
CAS con opción	17
Inactivación farmacológica.....	17
Sacrificio y perfusión	17
Análisis de los datos	18
Resultados:	19
La corteza orbitofrontal es necesaria para la elección guiada por una memoria gustativa pero no para la evocación de la misma	19
La corteza medial prefrontal no es necesaria para la elección guiada por una memoria gustativa	22
La corteza insular es necesaria para la evocación de una memoria gustativa.....	24
Resumen de resultados	26

Discusión.....	26
Conclusión	31
Bibliografía:.....	32

Agradecimientos

A mi tutor, el Dr. Francisco Sotres Bayón por su guía a lo largo del planteamiento y orientación de este proyecto así como por sus aportaciones y accesibilidad para discutir la dirección del mismo y los resultados obtenidos en todo momento.

A la técnico académico del laboratorio, la Dra. Leticia Ramírez Lugo por su asistencia y apoyo técnico al momento de planificar y llevar a cabo los experimentos, además de sus aportaciones en los detalles del proyecto y enriquecimiento de la discusión de sus resultados.

A mis compañeros y amigos -dentro y fuera- del laboratorio por las incontables discusiones científicas y por las no tan científicas que siempre han resultado en un sinnúmero de risas.

A mi familia, De las Peñas Nava, De las Peñas Rincón y a Pablo Betancourt por su apoyo incondicional.

A CONACYT por otorgar el apoyo económico para llevar a cabo este proyecto como parte del Posgrado en Ciencias Bioquímicas.

Resumen

Un aspecto adaptativo, fundamental para la supervivencia de un individuo, radica en tomar decisiones de manera óptima. En la naturaleza, una de las elecciones adaptativas de mayor trascendencia es decidir si evitar o ingerir un alimento. Estas elecciones suelen ser guiadas por una memoria que guarda la relación entre el estímulo gustativo y las consecuencias gastrointestinales de haberlo ingerido. Sin embargo, se sabe poco de los mecanismos cerebrales implicados en este proceso de elección entre opciones de alimentos basados en experiencias previas. Por un lado, sabemos que tanto la corteza medial prefrontal (CmPF) como la corteza gustativa primaria o corteza insular (CI) y la corteza gustativa secundaria o corteza orbitofrontal (COF), están involucradas en diferentes aspectos del procesamiento gustativo. Por otro lado, se ha reportado que la actividad neuronal de estas tres cortezas también correlaciona con algunos aspectos de la toma de decisiones. En este estudio evaluamos en un mismo paradigma conductual la participación de las cortezas antes mencionadas en conductas de elección guiadas por memorias gustativas. Utilizando condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) formamos una memoria gustativa en los animales al parear un sabor nuevo (sacarina) con malestar gástrico inducido por cloruro de litio. Posteriormente, evaluamos la evocación de la memoria gustativa mediante dos variantes del CAS: con opción y sin opción. La primera, consiste en presentar cuatro botellas, dos con sacarina intercaladas con dos de agua; la segunda, incluye una única botella con sacarina. Utilizando agonistas gabaérgicos (Muscimol y Baclofeno) inactivamos la corteza de interés durante la prueba. Observamos que tanto la CI como la COF, pero no CmPF, son necesarias para evocar la memoria del CAS con opción. Sin embargo, únicamente la CI y no la COF, está involucrada en la evocación de la memoria gustativa. Lo cual sugiere que, la COF, a diferencia de la CI, es necesaria para la toma de decisiones de manera independiente

a la evocación de la memoria. En resumen, en este trabajo encontramos una estructura necesaria para la elección pero no para la evocación de la memoria gustativa, la COF; una estructura, la CI, necesaria para la evocación de la memoria gustativa y por último, una estructura que no resultó necesaria para la toma de decisiones ni para la evocación de la memoria gustativa, la CmPF.

Introducción

La supervivencia de un individuo depende de la capacidad del mismo para tomar decisiones de manera óptima, es decir, aprender a seleccionar las opciones favorables o neutras y evitar aquellas perjudiciales. ¹ Para ello, es necesario experimentar las opciones disponibles y sus respectivas consecuencias ². Esta relación opción – consecuencia, es almacenada en forma de una memoria asociativa. De manera que, al enfrentar una elección cuyas opciones sean reconocidas, esta memoria dirigirá la conducta hacia una meta en específico: elegir las opciones favorables. ³

En la naturaleza encontramos elecciones que nos enfrentan a escoger entre estímulos gustativos. La ingesta de líquidos y sólidos es esencial para la supervivencia de un individuo, razón por la cual hemos evolucionado capacidades para distinguir los sabores seguros de los tóxicos. Existe una predisposición a preferir sabores dulces o salados sobre los ácidos u amargos pues estos últimos correlacionan con toxicidad ⁴. Desde el momento en que un estímulo gustativo entra en contacto con la cavidad oral, se pueden apreciar diferentes características físicas y químicas del mismo como su textura, temperatura, palatabilidad, etc. Esta experiencia sensorial ayuda a distinguir el alimento como agradable o desagradable y determina si será ingerido o rechazado. A este tipo de elecciones se les considera innatas pues no requieren de un aprendizaje para distinguir los sabores tóxicos de los seguros. Sin embargo, existen también las elecciones gustativas que conllevan un aprendizaje. Si el estímulo es categorizado como agradable entonces será ingerido y metabolizado. Entonces el alimento ahora será evaluado de acuerdo a las consecuencias gastrointestinales que provoque en el individuo. De ser positivas, neutras o apetitivas, este será considerado como

seguro o incluso puede ser clasificado como nutritivo si provee de energía al organismo. De lo contrario, será clasificado como negativo/aversivo si ocasiona malestar gástrico, náusea u algún otro efecto tóxico. Así es como se adquiere un repertorio de memorias gustativas basado en experiencias que guardan la representación de las características fisicoquímicas de un estímulo en relación con las consecuencias viscerales de haberlo ingerido ⁵. En la subsecuente presentación de un estímulo gustativo, el individuo se refiere a sus experiencias previas para reaccionar ante el mismo incrementando su ingesta o bien, evitándola. ^{4,6}.

Procesamiento de un estímulo gustativo

El procesamiento de un estímulo gustativo inicia en la cavidad oral. Al entrar en contacto con las papilas gustativas se recaba información sensorial que es transmitida al primer relevo del circuito, la región rostral del núcleo del tracto solitario (rNTS) dentro del tallo cerebral. La información viaja a través de los pares craneales que inervan lengua y paladar como son el nervio facial (VII) y el trigémino (V). Otras regiones que se encuentran recubiertas por papilas gustativas como laringe, faringe, la región posterior de la lengua y epiglotis son inervadas por el glossofaríngeo (IX) y el nervio vago (X) ⁷. El rNTS mantiene proyecciones anatómicas con la corteza motora a través de la cual emite una respuesta inmediata de aceptación/rechazo para evitar o proceder a deglutir un alimento ⁸. A partir de este momento la información gustativa se procesa de manera paralela a través de los diferentes relevos gustativos hasta llegar a las cortezas. Una vez ingerido el estímulo, la captura de información sensorial continúa a lo largo del sistema gastrointestinal y es recibida por el sistema nervioso central a

través del nervio vago (X). De nuevo, esta información alcanza el NTS pero esta vez la porción ventral, vNTS.^{8,9} De ahí la información se dirige hacia el núcleo parabraquial del puente quien recibe información tanto sensorial como visceral y la proyecta hacia el tálamo gustativo, específicamente a la porción parvocelular de la región ventro posteromedial del tálamo (VPMpc) (Samuelsen et al. 2013). Ambos tipos de información, alcanzan la corteza gustativa primaria o corteza insular (CI) quien la comparte de manera recíproca con diferentes estructuras como las cortezas prefrontales, tallo cerebral, amígdala, estriado ventral y la región lateral del hipotálamo. (Shi & Cassell 1998; Sowards 2004; Karimnamazi & Travers 1998 Parabucki & Netser 2014; Núñez-Jaramillo et al. 2010). Entonces, podemos decir que el procesamiento gustativo inicia en la cavidad oral, continúa a lo largo del sistema gastrointestinal y envía esta información a tallo cerebral desde el cual se comparte a diversas estructuras cerebrales que conforman la vía gustativa hasta alcanzar la CI.

Procesamiento cortical de un estímulo gustativo

La corteza insular

La corteza insular (CI), gracias a su composición neuronal multimodal, toma e integra información sensorial, cualitativa y cuantitativa acerca de un estímulo gustativo así como de su valor hedónico (Gal-Ben-Ari & Rosenblum 2011). Recibe información a través de VMPpc y -en menor medida- sólo en roedores, del PBN; ambas estructuras envían información tanto sensorial como visceral a la porción granular y disgranular de ésta corteza. Otras estructuras como amígdala, núcleo accumbens y la región lateral del hipotálamo proyectan hacia las regiones agranular y disgranular de la CI^{15,16}. A su vez, la CI proyecta y modula la actividad neuronal de los núcleos gustativos que se encuentran en el tallo cerebral como NTS y PBN¹⁷.

Al encontrarse involucrada en el procesamiento tanto sensorial como visceral de un estímulo gustativo, juega un papel importante en la formación de memorias gustativas. En protocolos conductuales que implican un aprendizaje y la formación de una memoria gustativa como el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), la inactivación de ésta corteza, de manera reversible (tetradotoxina) o irreversible (lesiones electrolíticas/ excitotóxicas), afecta la adquisición de la memoria y la evocación de la misma (Núñez-Jaramillo et al. 2010; Sowards 2004). Esta corteza es, por lo tanto, una estructura medular para el procesamiento de estímulos gustativos y la formación de memorias gustativas.

La corteza medial prefrontal

La corteza medial prefrontal (CmPF) pertenece a las cortezas prefrontales. Se ha estudiado en el procesamiento de estímulos gustativos pues recibe proyecciones aferentes de la CI, tálamo, hipotálamo y amígdala ^{5,13,19}. A su vez, proyecta hacia núcleos gustativos como amígdala, tálamo gustativo, hipotálamo, PBN y NTS. Mediante registros electrofisiológicos se ha observado que se activa en respuesta a estímulos gustativos de manera diferencial de acuerdo a la palatabilidad de los mismos ^{13,19}. También, se ha observado que juega un papel en la formación de memorias gustativas ya que, al inactivarla mediante lesiones excitotóxicas (ácido kaínico o 6-hidroxidopamina), antes o después de la adquisición del CAS, se irrumpe la formación de la memoria (Hernadi 2001). Además, se ha observado alta inmunoreactividad contra c-Fos en esta estructura, especialmente durante la extinción del CAS. Incluso, en caso de inactivarse durante la extinción, se impide este fenómeno⁵. Esta corteza, participa tanto en el procesamiento gustativo como en diversas etapas de la memoria gustativa.

La corteza orbitofrontal

La corteza orbitofrontal (COF) forma parte de las cortezas prefrontales. Recibe aferentes directamente de la CI por lo que es considerada corteza gustativa secundaria ²¹⁻²³. También recibe proyecciones del hipotálamo lateral, área preóptica, amígdala ²³ y a su vez, proyecta hacia tallo cerebral (NTS, PBN), estriado ventral y amígdala ^{24,25}, permitiendo una modulación del procesamiento gustativo. Mediante registros electrofisiológicos, se ha observado que la COF se activa en tareas conductuales que involucran una elección guiada por estímulos gustativos ^{8,26}. En el trabajo presentado por MacDonald et al. 2009, donde comparan ambas cortezas gustativas (COF y CI) mencionan que, ambas se activan al momento de recibir el estímulo gustativo (cloruro de sodio en dos concentraciones diferentes) que señala el puerto a elegir (izquierdo o derecho de acuerdo a la concentración del cloruro de sodio) para recoger su recompensa o reforzador -gotas de agua-. Estas se activan diferencialmente a lo largo de las diferentes etapas de la tarea desde el contacto con el estímulo, su discriminación y la elección del puerto. Existen además reportes que confirman la activación de esta corteza de manera anticipatoria a la entrega de un reforzador -gustativo- así como de su activación diferencial en respuesta a un estímulo condicionado de tipo gustativo de acuerdo al valor del reforzador que este representa ²². Incluso se ha reportado que esta corteza presenta una actividad moduladora sobre el movimiento lingual en respuesta a la palatabilidad de un estímulo gustativo ²⁷. En conjunto, esta serie de evidencias plantean a esta corteza como una estructura implicada en el procesamiento gustativo así como en elecciones que conllevan el uso de reforzadores gustativos.

Procesamiento cortical de la toma de decisiones

La corteza prefrontal e insular en la toma de decisiones

Las cortezas prefrontales (CmPF y COF) integran información de diversas regiones cerebrales, corticales y subcorticales. Las CmPF en particular se ha visto que participa en la regulación emocional, en particular del miedo²⁸ y decisiones sobre la evitación activa del mismo ²⁹. Ambas juegan un papel importante en el procesamiento de información para construir respuestas adaptativas óptimas al momento de enfrentar una elección (Euston et al. 2012; Rolls & Grabenhorst 2008). Participan en habilidades cognitivas como lo son el control inhibitorio, la flexibilidad cognitiva ² y en el aprendizaje reversa ³¹. En conjunto, estas funciones cognitivas promueven un óptimo desempeño al llevar a cabo acciones dirigidas hacia una meta en específico. Se ha reportado que ratas con lesiones farmacológicas de diversos grados en regiones de la corteza prefrontal, como la CmPF o COF, los incapacita para elegir las opciones ventajosas por encima de las no ventajosas, aún a partir de experiencias previas. Estas deficiencias se han evaluado en diversos paradigmas que involucran elegir una opción entre dos o más ^{2,32,33}. En conjunto, esta información describe a estas cortezas como participantes tanto en el procesamiento gustativo como en la elección. Sin embargo, no es claro si están involucradas en decisiones que impliquen el uso de una memoria gustativa para guiar un comportamiento hacia una meta en específico. Es por ello que son estructuras blanco de este trabajo para ser evaluadas en un modelo conductual que implica tomar una decisión guiada por una memoria gustativa.

La CI, por su parte también se ha estudiado en elecciones que involucran estímulos gustativos. Al ser inactivada momentos previos a una elección que involucra la evocación de

una memoria, cuyo contenido señala la devaluación de un estímulo gustativo, el animal es incapaz de evitar la opción devaluada.³⁴ Además, en tareas que implican discriminación de estímulos gustativos para llevar a cabo una elección, se registra actividad neuronal antes y durante el contacto con el estímulo, así como al momento de la elección³⁵. Recapitulando, esta corteza es requerida tanto para el procesamiento gustativo como para la formación de una memoria gustativa y también participa en elecciones guiadas por estímulos gustativos. Es, por tanto, una estructura interesante a evaluar en nuestro modelo de toma de decisiones guiada por una memoria gustativa.

Antecedentes

El modelo conductual

En el laboratorio se utilizó el protocolo clásico de condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) con una sola botella, nos referiremos a él como CAS sin opción. Así mismo se implementó una variación de este en el cual se utilizan cuatro botellas para evaluar la toma de decisiones: CAS con opción. En ambos protocolos, el animal aprende a asociar un sabor nuevo como la sacarina, con malestar gástrico inducido por la administración intraperitoneal de cloruro de litio. Esta asociación se guarda en forma de memoria. De manera tal que, al presentar por segunda vez la sacarina, ahora percibida como un estímulo aversivo, los animales evocan la memoria y evitan la sacarina³⁶. En la variante con opción, se presentan cuatro botellas simultáneamente, de las cuales dos contienen agua y son intercaladas con dos de sacarina; la tarea sin opción consiste en presentar una única botella con sacarina. En ambas modalidades, la prueba consiste en evaluar la evocación de la memoria gustativa durante la segunda presentación de la sacarina. Durante la Prueba se inactiva la estructura cerebral de interés y se evalúa el comportamiento de los animales inactivados respecto a los controles.

Si los animales inactivados durante el CAS con opción, beben el agua y evitan la sacarina, entonces esta estructura no participa en la elección ni en la evocación de la memoria gustativa. Si, por el contrario, los animales inactivados beben tanto el agua como la sacarina, en vez de evitar esta última, estos resultados pudieran deberse a que 1) la estructura participa en la elección o bien, 2) participa en la evocación de la memoria gustativa. En ese caso la estructura deberá ser evaluada utilizando el protocolo de CAS sin opción, herramienta que nos permite distinguir entre estas dos posibilidades pues evalúa únicamente la evocación de la memoria gustativa sin presentar opciones. Si los animales con la misma estructura inactivada beben sacarina en vez de evitarla durante la Prueba de CAS sin opción, entonces la estructura participa en la evocación de la memoria gustativa y no en la elección *per se*. En el caso contrario, si los animales inactivados evitan la sacarina, querría decir que la estructura en cuestión no participa en la evocación de la memoria gustativa y confirma su participación en la elección. En conjunto, estas dos pruebas nos permiten disectar el fenómeno observado como parte del análisis de los resultados en este trabajo.

Planteamiento del problema

Las experiencias gustativas forman una memoria que surge como consecuencia del procesamiento de un estímulo a través de los circuitos gustativo y visceral. Ciertas estructuras corticales como la corteza gustativa primaria, secundaria y la medial prefrontal están involucradas en diferentes estadios del procesamiento gustativo así como de la formación de una memoria gustativa. La elección está determinada por las cortezas prefrontales quienes, a su vez, mantienen conexiones anatómicas con las cortezas gustativas. Se busca entonces, entender si la corteza gustativa primaria y las cortezas medial prefrontal y orbitofrontal son estructuras *necesarias* para la elección guiada por memorias

gustativas.

Pregunta de investigación

¿Qué región cortical (insular, orbitofrontal o prefrontal medial) involucrada en procesamiento gustativo y toma de decisiones es necesaria para guiar conductas de elección basadas en memorias gustativas?

Hipótesis

Las cortezas prefrontales (medial y orbital) pero no la corteza insular, son necesarias para conductas de elección guiadas por memorias gustativas

Objetivos:

1. Determinar si la corteza orbitofrontal es *necesaria* para conductas de elección guiadas por memorias gustativas.
2. Determinar si la corteza medial prefrontal es *necesaria* para conductas de elección guiadas por una memoria gustativa.
3. Determinar si la corteza insular es *necesaria* para conductas de elección guiadas por una memoria gustativa.

Métodos

Sujetos experimentales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, machos, con un peso inicial de 270-300 gramos perteneciente a una colonia criada en el Instituto de Fisiología Celular. Los animales se mantuvieron en el *vivarium* en cajas individuales a una temperatura controlada (24°C) bajo ciclos de luz/oscuridad con una duración de 12 horas cada uno. Todas las manipulaciones fueron hechas durante el ciclo de luz. Los animales se mantuvieron en una dieta de agua y chow *ad libitum* antes de comenzar el experimento. Durante el experimento los animales fueron manipulados diariamente para mitigar el estrés que pudiera ocasionar la manipulación humana. Todos los procedimientos fueron avalados por el Instituto de Cuidado y Uso Animal de la Universidad Nacional Autónoma de Ciencias.

Cirugía

Los animales fueron sometidos a una cirugía estereotáxica para la cual fueron previamente anestesiados con un coctel de Ketamina (90mg/Kg) y Xilacina(10mg/Kg) administradas intramuscularmente. Se insertaron cánulas guía (de 15 mm, hipodérmicas de acero inoxidable, A-M system.) de calibre 23 en la región de interés: corteza medial prefrontal ([AP]= +2.9 mm; [ML]= ±0.6 mm; [DV]= -3.4 mm), corteza orbitofrontal ([AP]= +3.8; [ML]= ±2.6 mm; [DV]= -2.9 mm)³³. corteza insular ([AP]= +1.2 mm; [ML]= ±5.5 mm; [DV]= -5.7 mm)³⁷. Todas las coordenadas fueron calculadas respecto a Bregma. Las cánulas fueron fijadas al cráneo utilizando cemento dental acrílico anclado a dos tornillos fijados al cráneo. A las

cánulas se les insertó un obturador de menor diámetro para mantenerlas destapadas hasta que se llevaron a cabo las infusiones. Las puntas de las cánulas fueron colocadas 0.8 mm por encima de la estructura blanco. Después de la cirugía los animales recibieron comida y agua *ad libitum* durante una semana, para permitir su completa recuperación.

Conducta

Los animales se privaron de agua 24 horas previas al inicio del experimento para motivarlos a beber al momento de presentar la(s) botella(s). Fueron entrenados a recibir su consumo de agua en uno o cuatro bebederos (12 ml) durante 10 min seguido por un bebedero extra (6 ml) durante 10 min; cada consumo se presentó dos veces al día con 6 hrs de diferencia entre consumos por cinco días. A este periodo le llamamos Línea Base, al término de esta etapa, se realizó la adquisición del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) en donde se presentó un estímulo gustativo nuevo (sacarina 0.1%) como estímulo condicionado (EC) y 15 min después se administró una inyección intraperitoneal de cloruro de litio (LiCl, 0.4M) para inducir malestar gástrico como estímulo incondicionado (EI). El aprendizaje se evaluó 24 horas después de la adquisición, durante la Prueba1 o la Prueba2, correspondientes al primer y segundo consumo de sacarina post- adquisición. La inactivación durante la Prueba2 nos permitió tener un control del nivel de aversión/aprendizaje de los animales (i.e. la primera presentación de la sacarina post-adquisición) de acuerdo a su consumo de sacarina. La inactivación durante la Prueba 1 no nos permitió tener este control, sin embargo, el aprendizaje en los animales fue robusto a lo largo de los experimentos cuyas inactivaciones fueron llevadas a cabo durante la Prueba 2. La Prueba consistió presentar el EC pero no el EI.

CAS sin opción

Durante la línea base, en cada consumo se presentó un solo bebedero seguido del bebedero extra. La adquisición del CAS se llevó a cabo presentando primero el bebedero extra y después la botella con el EC para que el último estímulo que bebieran los animales antes de la inyección de LiCl fuera la sacarina.

CAS con opción

Durante la línea base, en cada consumo se presentaron cuatro botellas al mismo tiempo seguidas del bebedero extra. Al término de la línea base se llevó a cabo la adquisición en donde se les presentaron primero los cuatro bebederos (dos con sacarina intercalados con dos de agua) y en seguida el bebedero extra que, únicamente durante la adquisición, también contenía sacarina. A continuación, se les administró la inyección del LiCl.

Inactivación farmacológica

En la corteza orbitofrontal y medial prefrontal, se infundió bilateralmente 0.5 µl de un coctel 1:1 de agonistas gabaérgicos GABA_A y GABA_B, Muscimol y Baclofeno (0.250 µg/µl c/u) o bien 0.5 µl de salina (0.9%) al grupo experimental y vehículo, respectivamente. Se infundieron a una velocidad de 0.4 µl/min.³³ La inactivación se llevó a cabo 24 horas posteriores a la adquisición y 10 min previos a la Prueba1 o Prueba2. En la corteza insular se siguió el protocolo descrito en el trabajo presentado por Berman et al. 2000 donde infunden 1 µl de una concentración de 5 µg/ µl de Muscimol a una velocidad de 1 µl/ min.

Sacrificio y perfusión

Al término de las pruebas, los animales fueron sacrificados utilizando hidrato de cloral para

su perfusión, en la cual se utilizó salina (0.9%). Se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en formalina durante cuatro días. Posteriormente fueron sumergidos en una solución de formalina con sacarosa (30%). Finalmente fueron cortados en criostato. Se obtuvieron rebanadas de 40 µm colocadas en laminillas para su tinción con Violeta de Cresilo y montadas con Permaunt (Fisher Scientific) para verificar la zona en la que se colocaron las cánulas.

Análisis de los datos

Cada experimento comenzó con 25 animales, fueron descartados aquellos animales cuyo casco de cemento conteniendo las cánulas se desprendió, o bien, algún animal que haya sufrido alguna infección post-cirugía. Los animales considerados para el análisis estadístico fueron aquellos cuyas puntas de las cánulas cayeron dentro del área cerebral esperada. Los datos fueron analizados en el programa estadístico, Statistica. Para todos los experimentos se hicieron Pruebas de T no pareadas pues el consumo de sacarina era independiente entre los grupos experimental y control. Consideramos como significativo $p \leq 0.05$. Los consumos de cada animal durante la Adquisición, Prueba 1 y Prueba 2, fueron transformados a porcentaje respecto al promedio de consumo de agua durante su línea base de la mañana o de la tarde. Ejemplo: $\frac{Adquisición(mL)*100}{Línea Base (mL)}$

Resultados:

La corteza orbitofrontal es necesaria para la elección guiada por una memoria gustativa pero no para la evocación de la misma

La CI presenta proyecciones hacia las cortezas prefrontales y estas además reciben información de otros núcleos del sistema gustativo y visceral. En el laboratorio evaluamos la participación de una de ellas, la COF, en la elección motivada por memorias gustativas. Para ello, utilizamos una prueba conductual que nos permitiera evaluar este fenómeno, el CAS con opción (i.e. la modalidad de cuatro botellas). En **Fig. 1A** observamos diferencias significativas en el consumo de sacarina del grupo control respecto al experimental durante la Prueba 1; el grupo experimental bebió significativamente más sacarina que el control (M&B: 66.8%, Veh: 27.2%, $t_{15} = 3.24$, $p = 0.005$). El control presentó aversión como era esperado dado el condicionamiento. En vista de que ambos grupos habían tenido un consumo similar de sacarina durante la adquisición del CAS (Veh = 103.14%, M&B = 102.53%, $t_{15} = -0.27$, $p = 0.79$) y que ambos grupos estaban motivados a beber como se aprecia en el consumo del bebedero extra (**Fig. 1A inserto** Veh: 105.3%, M&B: 114.7%; $t_{15} = -1.27$, $p = 0.22$), podemos decir que las diferencias observadas durante la Prueba 1 son consecuencia de la inactivación de la COF y no a diferencias en estas variables. En la **Fig. 1B** observamos un esquema representativo de la histología correspondiente a este experimento, donde se muestra la zona del cerebro en la que cayeron las puntas de las cánulas de los animales incluidos en el análisis. Con este experimento concluimos que la participación de la COF es necesaria para llevar a cabo una elección guiada por una memoria gustativa.

Dados los resultados obtenidos en el experimento anterior, nos preguntamos si el efecto observado pudiera deberse a que la inactivación de la COF incidiera negativamente en la

evocación de la memoria gustativa y no a deficiencias al momento de la elección *per se*. Para descartar esta posibilidad, utilizamos una prueba conductual que nos permitió evaluar únicamente la memoria gustativa: el protocolo de CAS sin opción (i.e. la modalidad de una sola botella). Como se observa en la **Fig. 1C**, durante la Prueba1, el grupo experimental no presenta diferencias significativas respecto al control en el consumo de sacarina (Veh: 24.25%, M&B: 28.65%, $t_{13} = -0.43$, $p = 0.67$). Ambos bebieron bajas cantidades de sacarina respecto a su consumo durante la adquisición, es decir, presentaron aversión a la sacarina (Veh: 91.71%, M&B 95.61%, Prueba de T, $t_{13} = -0.82$, $p = 0.42$). Ambos grupos estaban motivados a beber como se observa en su consumo del bebedero extra (**Fig. 1C inserto** Veh: 131.96%, M&B: 197.37%, Prueba de T, $t_{13} = 1.25$, $p = 0.23$). En la **Fig. 1D** se observa un esquema representativo de los puntos en donde cayeron las cánulas de los animales incluidos en el análisis. Estos resultados indican que la memoria gustativa puede ser evocada pese la inactivación de la COF y que el efecto observado por la inactivación de la COF durante la elección no se debe a que los animales no hayan aprendido la asociación sacarina–malestar gástrico o a una falta de motivación en los animales para beber. Estos resultados apoyan la interpretación de que el efecto apreciado en el CAS con opción se debe a que la inactivación de la COF es un impedimento para el desempeño de los animales en la elección. La COF no es *necesaria* para la evocación de una memoria gustativa aversiva pero sí para la toma de decisiones motivada por esta memoria.

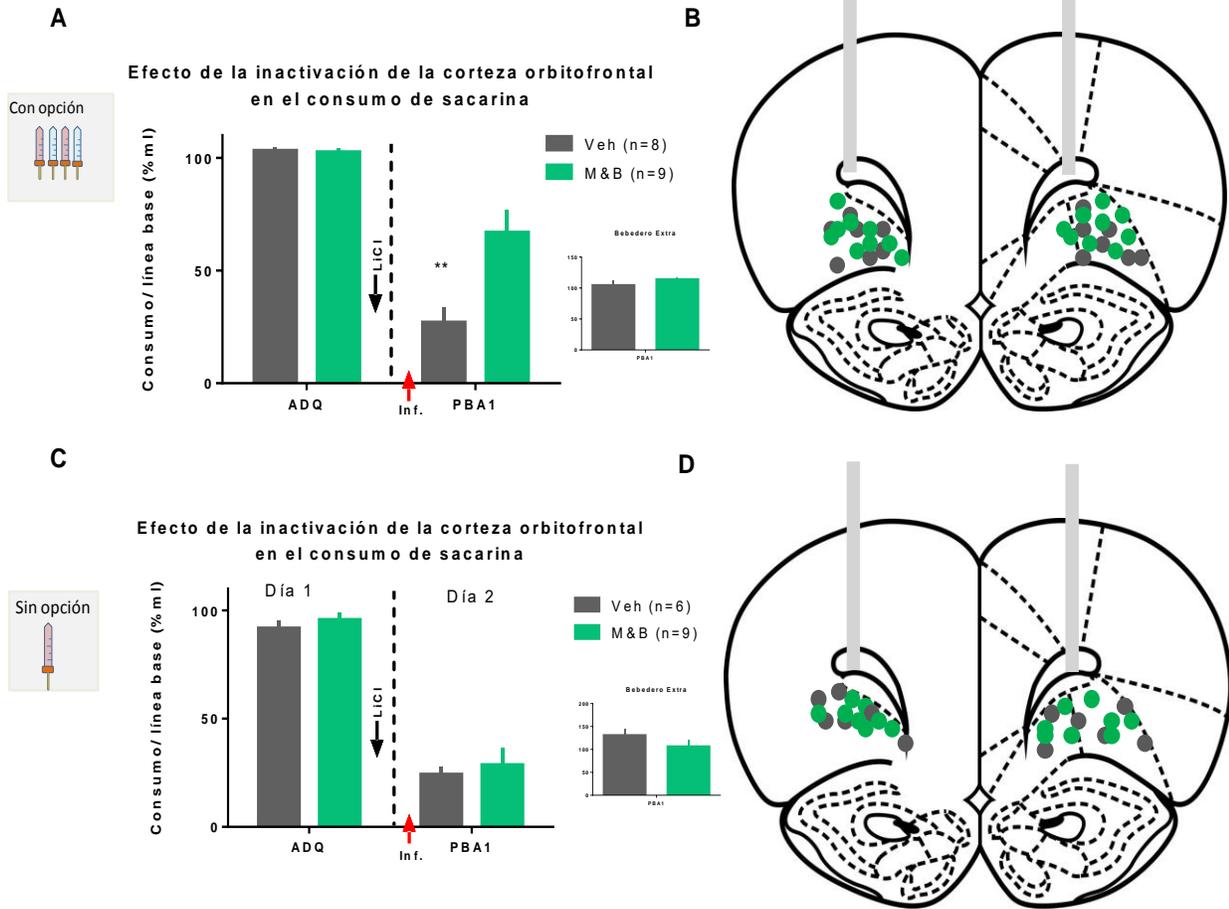


Figura 1. La corteza orbitofrontal participa en la selección de una acción guiada por estímulos gustativos pero no en la evocación de la memoria gustativa. En A y C) Consumo de sacarina del grupo experimental (M&B, Muscimol y Baclofeno, verde) y el grupo control (Veh, vehículo; gris). En A) CAS con opción, Prueba T en PBA1, $p=0.005$. En C) CAS con opción, Prueba T en PBA1, $p=0.67$. En B y D) Esquemas del lugar en donde cayeron las puntas de las cánulas. Eje de las Y, consumo de sacarina en ml expresado en porcentaje respecto a la línea base. Eje de las X, adquisición (ADQ) y Prueba1 (PBA1). Inf.: infusión.

La corteza medial prefrontal no es necesaria para la elección guiada por una memoria gustativa

El efecto observado en la COF sobre la elección guiada por memorias gustativas nos llevó a evaluar otras cortezas prefrontales que, al igual que la COF, se han estudiado en la toma de decisiones y mantienen conexiones anatómicas con la CI como es el caso de CmPF. Se realizaron dos experimentos en los que la estructura fue inactivada durante la Prueba 1 y Prueba 2 utilizando el protocolo conductual de CAS con opción. En este caso inactivamos en ambas pruebas para eliminar la posibilidad de que los resultados obtenidos pudieran deberse a la temporalidad de la inactivación. En las **Figs. 2A y C** observamos que durante la inactivación de la estructura no se aprecian diferencias significativas en el consumo de sacarina entre el grupo experimental y el control tras la inactivación de la estructura durante las pruebas 1 y 2, respectivamente (Fig. 2A, Veh: 45.66%, M&B: 38.46%; $t_{11} = -0.46$, $p = 0.64$) (Fig. 2C, Veh: 49.08%, M&B: 52.85%; Prueba de T, $t_{12} = 0.22$, $p = 0.82$). Cabe resaltar que en los consumos observados en ambas figuras durante las pruebas 1 y 2 (**Fig. 2A y C**) tanto el grupo experimental como el control bebieron considerablemente menos sacarina respecto a su consumo durante la adquisición, es decir ambos grupos presentaron aversión a la sacarina independientemente de la inactivación de la estructura en el grupo experimental (Fig. 2A, Veh: 104.49%, M&B: 103.87%, $t_{11} = -0.23$, $p = 0.81$) (Fig. 2C, 102.17%, M&B: 103.59%, $t_{12} = 0.61$, $p = 0.55$). Además, los animales estaban motivados a beber pues en ambos experimentos se observa el consumo del bebedero extra (Fig 2A, Veh: 170.25%, M&B: 166.42%, $t_{11} = -0.31$, $p = 0.75$) (Fig. 2C, Veh: 130.22%, M&B: 109.86%, $t_{12} = -1.45$, $p = 0.17$). En las **Figs. 2B y D** observamos un esquema representativo de la zona en la que cayeron todas las cánulas correspondientes a las ratas incluidas en el análisis estadístico. Estos datos sugieren que la CmPF no es necesaria para la elección guiada por una memoria

gustativa, independiente de la temporalidad de la inactivación de la estructura y tampoco es necesaria para la evocación de la memoria gustativa pues tanto el grupo inactivado como el control presentaron aversión a la sacarina durante la Prueba.

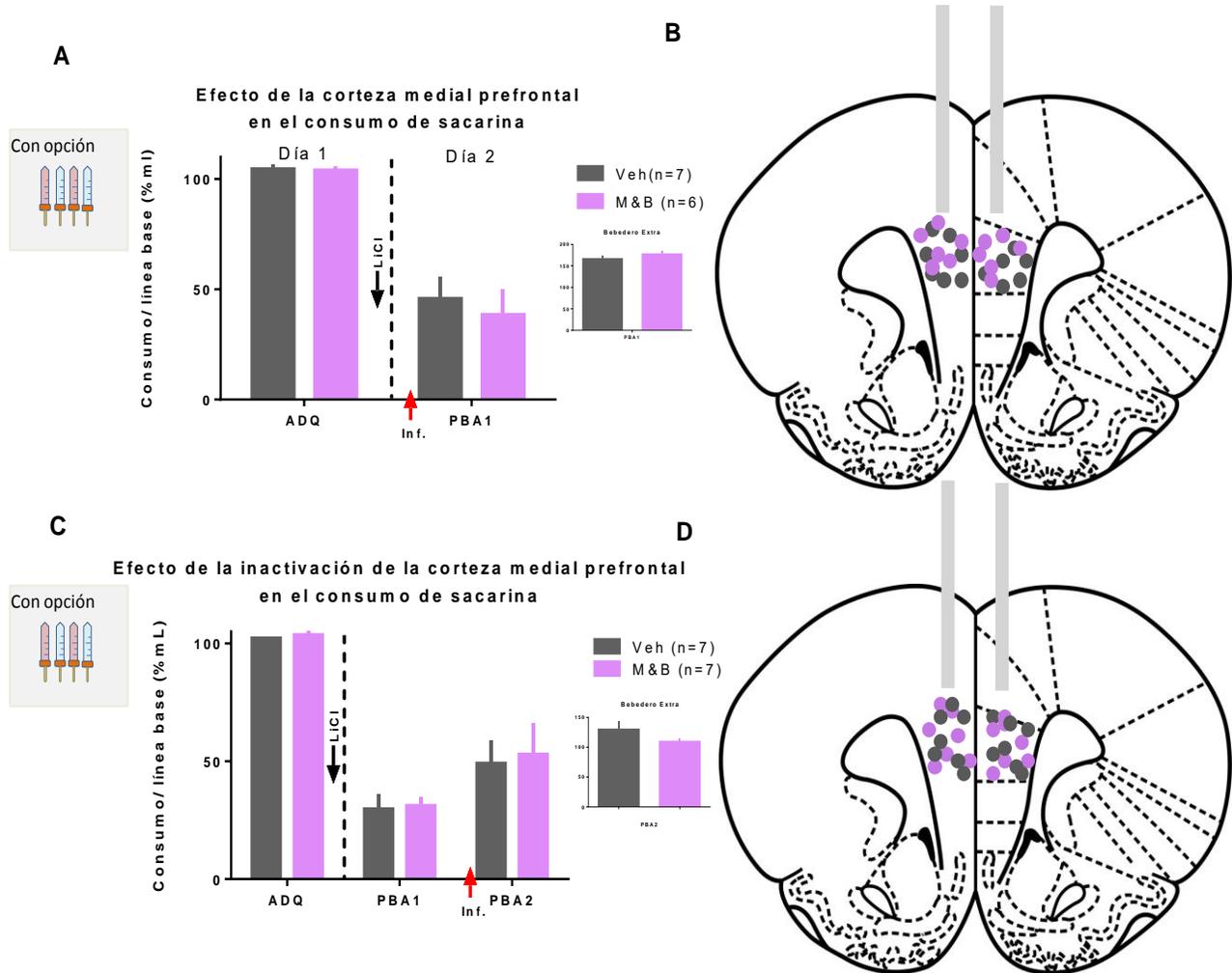


Figura 2. La inactivación de la corteza medial prefrontal no afecta toma de decisiones guiada por una memoria gustativa. A) Consumo de sacarina del grupo experimental (M&B, Muscimol y Baclofen, lila) y el grupo control (Veh, vehículo; gris). B) Esquema del lugar en donde cayeron las puntas de las cánulas. Eje de las Y, consumo de sacarina en ml expresado en porcentaje respecto a la línea base. Eje de las X, adquisición (ADQ), Prueba1 (PBA1) y Prueba2 (PBA2). Inf.: infusión. Prueba de T: PBA1 $p=0.648$; PBA2 $p=0.82$.

La corteza insular es necesaria para la evocación de una memoria gustativa

Evaluamos el papel de la CI en la toma de decisiones y en la evocación de la memoria gustativa en los protocolos de CAS con y sin opción, respectivamente. Diseñamos este experimento para evaluar otra corteza gustativa además de la COF que sabemos, por reportes previos, que está involucrada en la evocación de la memoria gustativa ⁵. En la **Fig. 3A** se observan diferencias en el consumo de sacarina del grupo experimental respecto al control durante la Prueba 1 donde el consumo del grupo experimental es significativamente mayor que el control (Veh: 41.92%, M&B: 62.44%, $t_{20} = 1.98$, $p = 0.06$). Ambos grupos habían presentado un consumo similar de sacarina durante la adquisición del condicionamiento (Veh: 102.21%, M&B: 96.47%, $t_{20} = -1.2$, $p = 0.22$) y del bebedero extra durante la Prueba (Veh: 104.12%, M&B: 65.8%, $t_{20} = -3.36$, $p = 0.003$). Con lo cual podemos decir que la disminución del consumo de sacarina por parte del grupo control es debido a que presentan la aversión esperada hacia la sacarina como consecuencia del CAS y que las diferencias presentadas respecto al grupo experimental se deben a la inactivación de la estructura. El consumo del bebedero extra nos dice que ambos grupos estaban igualmente motivados a beber y que las diferencias observadas durante la prueba no se deben a esta variable. Para esclarecer si los resultados observados se deben a la participación de esta corteza en la elección o en la evocación de la memoria, la evaluamos bajo el protocolo de CAS sin opción. En la **Fig. 3C** observamos diferencias en el consumo de sacarina entre el grupo experimental respecto al control durante la Prueba en donde el grupo experimental bebió significativamente más sacarina que el control (Veh: 61.89%, M&B: 33.43%, $t_{18} = -2.39$, $p = 0.02$). Dado que el consumo de sacarina de ambos grupos durante la adquisición (Veh: 98.71%, M&B: 92.41%, $t_{18} = -0.68$, $p = 0.5$) y del bebedero extra durante la Prueba 1 (Veh: 102.74%, M&B: 93.66%,

$t_{18} = 1.51, p = 0.14$) no son significativamente distintos, podemos decir que los resultados observados en el consumo de sacarina durante la Prueba se deben a la inactivación de la CI. En las **Figs. 3B y D** observamos un esquema representativo de la zona en la cual cayeron las puntas de las cánulas de todos los animales incluidos en el análisis estadístico. Este resultado señala que, contrario a lo observado con la COF, la CI es *necesaria* para la elección por ser *necesaria* para la evocación de la memoria gustativa. Evidencia que apunta a una función diferencial de cada una de las cortezas gustativas, COF y CI, durante la elección cuando esta es mediada por una memoria gustativa.

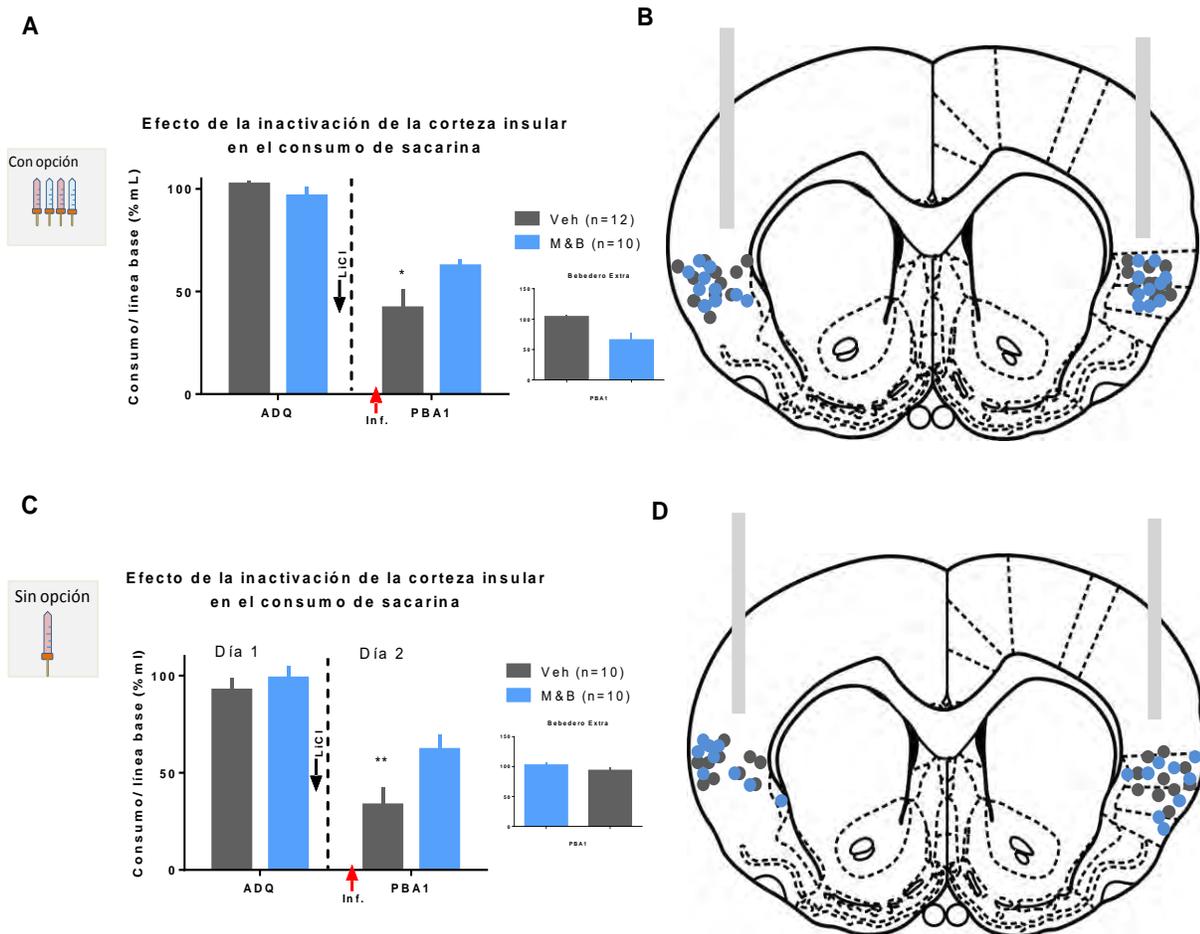


Figura 3. La inactivación de corteza insular tiene un efecto en la evocación de la memoria y en la selección de una acción. A) Consumo de sacarina del grupo experimental (M&B, Muscimol y Baclofen, azul) y el grupo control (Veh, vehículo; gris). B) Esquema del lugar en donde cayeron las puntas de las cánulas. Eje de las Y, consumo de sacarina

en ml, expresado en porcentaje. Eje de las X, adquisición (ADQ) y Prueba1 (PBA1). Inf.: infusión. Prueba de T en PBA1 en CAS con opción p=0.06 y en CAS sin opción p=0.02.

Resumen de resultados

1. La corteza orbitofrontal o corteza gustativa secundaria es *necesaria* para la elección guiada por una memoria gustativa más no para la evocación de la misma.
2. La corteza medial prefrontal *no es necesaria* para la elección guiada por una memoria gustativa.
3. La corteza insular o corteza gustativa primaria es *necesaria* para la elección y para la evocación de una memoria gustativa.

Discusión

La habilidad para llevar a cabo una decisión guiada por una memoria gustativa recae tanto en el procesamiento gustativo como en las cortezas encargadas de la toma de decisiones. Sin embargo, quedaba por esclarecer la participación de las cortezas prefrontales en una elección mediada por una memoria gustativa. En este trabajo encontramos que las dos cortezas gustativas, COF y CI, participan en una elección cuando esta es encauzada por una memoria gustativa, no así la CmPF. Cabe resaltar que únicamente la COF resultó necesaria para la toma de decisiones y no para la evocación de la memoria gustativa. A diferencia de la COF, al evaluar la CI observamos que sí es necesaria para la evocación de una memoria gustativa; resultado esperado dados estudios previos que la involucran no sólo en la formación de memorias gustativas sino en la evocación de las mismas (Núñez et al. 2010).

En conjunto, estos resultados resaltan el papel de la COF como una estructura capaz de utilizar la información gustativa para guiar una elección como la enfrentada bajo nuestro modelo de CAS con opción.

Al inactivar la COF durante la elección, los animales son incapaces de consumir selectivamente el estímulo gustativo seguro y alejarse del riesgoso como observamos en el comportamiento de los animales control. Estos resultados pudieran estar sugiriendo que la inactivación de esta corteza impide a los animales percibir los estímulos gustativos y eso explicaría porque beben sacarina y agua indistintamente. Sin embargo, en el laboratorio se probó esta hipótesis al evaluar la participación de la COF en una elección que implica la preferencia o el rechazo de estímulos innatamente agradables o desagradables; es decir una elección que no implica un aprendizaje. Se utilizaron dos estímulos en concentraciones naturalmente agradables o naturalmente aversivas como la sacarina -dulce- y la quinina -amarga-, respectivamente. El experimento siguió el mismo protocolo conductual y la inactivación farmacológica de la COF detallados en la metodología de este trabajo. Los resultados obtenidos indicaron que los animales con la COF inactivada eran capaces de elegir la sacarina y evitar la quinina. Por lo tanto quedó descartada la posibilidad de que el efecto observado en este trabajo, sobre la participación de la COF durante la toma de decisiones guiada por un aprendizaje gustativo, se deba a que los animales sean incapaces de percibir los estímulos gustativos. Cabía también la posibilidad de que el efecto observado por la inactivación de la COF durante la elección, se debiera a que inactivar esta corteza impidiera al animal abordar una tarea cognitiva más demandante (i.e. cuatro bebederos en lugar de uno). Se realizó un experimento para aproximar esta hipótesis utilizando una tarea conductual en donde la adquisición se llevó a cabo con un bebedero pero durante la prueba se presentaron cuatro bebederos simultáneamente, todos con sacarina. Se observó que los

animales eran capaces de evitar los cuatro bebederos con sacarina aún a pesar de tener la COF inactivada. En conjunto, estos resultados apoyan la interpretación de que la COF efectivamente es necesaria para la elección mediada por un aprendizaje gustativo y esto no se debe a un impedimento en la evocación de la memoria, en la percepción de los estímulos gustativos o en la capacidad del animal para abordar una tarea compleja.

¿A qué propiedades de la COF podría adjudicarse su participación en la elección mediada por una memoria gustativa? Esta corteza ha sido referida como partícipe de la capacidad inferencial o predictiva sobre consecuencias no inmediatas como ocurre con la devaluación de un estímulo previamente asociado a LiCl ^{3,39}. En cuyo caso, inactivar la COF impediría al animal inferir las consecuencias de consumir el estímulo riesgoso -sacarina- que le había ocasionado malestar gástrico anteriormente. O bien, otra manera de explicar su participación en el CAS con opción, pudiera deberse a su desempeño en la emisión de un juicio basado en la valoración de un estímulo, en particular en la asignación del valor relativo a un estímulo cuando éste es presentado al mismo tiempo que otros. El valor de un estímulo no es un valor fijo, es más bien variante de acuerdo a factores internos y externos al organismo y se reajusta de acuerdo a las circunstancias (Fellows 2007). Lo cual permite calcular cuál de todas las opciones es la que tendría el valor más alto bajo las circunstancias dadas. En nuestro modelo, al inactivar la COF durante la elección pudiera estarse impidiendo la correcta valoración del estímulo seguro respecto al riesgoso resultando en la ingesta indistinta de ambos estímulos, lo cual explicaría los resultados obtenidos.

El papel de la COF en nuestro paradigma de elección es elemental pero no es un actor aislado. Cabe resaltar que está llevando a cabo una acción cognitiva, como es la elección, haciendo uso de información recabada y retenida en otras estructuras que forman parte del procesamiento gustativo, como la CI, y no en sí misma. Lo anterior es interesante pues

resalta la especialización de estructuras en una tarea en particular. Además, apunta a una comunicación funcional entre ambas estructuras al momento de enfrentar una elección. Si quisiéramos saber si esta conectividad es necesaria para este tipo de elecciones habría que abordar el problema desde otro ángulo. Hay estudios que evalúan la conectividad funcional entre dos estructuras utilizando protocolos de desconexión en donde se inactiva únicamente la vía anatómica que conecta ambas estructuras sin comprometer la función de las mismas ³⁴. Así podríamos evaluar si la comunicación funcional entre la COF y la CI es necesaria al momento de enfrentar una elección que implica elementos gustativos previamente aprendidos. En ese sentido ayudaría a elucidar otros elementos neurales que van más allá de la participación estructural hacia la conectividad, que pudieran ser necesarios en este tipo de elecciones junto con la COF.

Respecto a la CI, el haberla encontrado necesaria para la evocación de la memoria al momento de hacer una elección tiene sentido de acuerdo a lo antes reportado pues es una corteza que guarda tanto la asociación gustativa como el valor de un estímulo gustativo ^{5,34,41,42}. Entre las limitantes de nuestro modelo conductual, se encuentra el no poder disectar la participación de una estructura que mostró ser partícipe en la evocación de la memoria gustativa, como la corteza insular, de su papel en la toma de decisiones. Para desmenuzar más finamente este proceso podrían plantearse el uso de otras metodologías, como electrofisiología, que pudieran dilucidar la participación de la esta corteza en diferentes temporalidades durante un evento de elección. Se ha reportado evidencia electrofisiológica de que ambas cortezas gustativas, insular y orbitofrontal, disparan durante una tarea de discriminación y toma de decisiones (MacDonald et al. 2009). Los autores discuten que probablemente en su tarea la CI guarda información relacionada a la evocación de la

memoria gustativa mientras que, la COF probablemente señalice y dirige la elección guiada por esta memoria, más que la memoria *per se*. Sin embargo, esta es tan sólo una interpretación pues esas respuestas sólo se pueden adquirir mediante protocolos que implican la pérdida de función, ya sea por inactivaciones o lesiones. Lo trascendente del trabajo presentado en esta tesis es justamente que haciendo uso de inactivaciones podemos aseverar que: 1) la COF es necesaria para la toma de decisiones pero no para la evocación de la memoria gustativa, la 2) CI es necesaria para la evocación de la memoria gustativa y 3) la CmPF no es necesaria para ninguna de las dos conductas aquí evaluadas.

En cuanto a la corteza medial prefrontal, el no haber encontrado un efecto en esta corteza pero sí en la COF es interesante pues indica que, a pesar de que ambas estructuras han sido estudiadas en la toma de decisiones ^{2,23,40} y que ambas mantienen conexiones anatómicas con la corteza insular y otras estructuras del procesamiento gustativo, juegan papeles distintos en el uso de la información gustativa de acuerdo al tipo de elección que se lleve a cabo.

Queda por evaluar posibles estructuras subcorticales que pudieran estar involucradas en nuestro modelo de elección guiada por una memoria gustativa. Una estructura interesante que mantiene proyecciones anatómicas con la COF cuya actividad electrofisiológica coincide en temporalidad con la de la COF en momentos de decisión, es el estriado ventral ^{25,43}. Esta estructura es un candidato interesante a ser evaluado en nuestro modelo.

Conclusión

La COF es necesaria para la elección guiada por una memoria gustativa, lo cual tiene sentido en función de los reportes que la involucran tanto en la elección como en la valoración de estímulos gustativos. Aunque, interesantemente, no mostró ser necesaria para la evocación de la memoria gustativa pese a ser considerada la corteza gustativa secundaria. Por el contrario, la corteza insular, resultó necesaria para la evocación de la memoria gustativa, lo cual respalda los vastos reportes que la involucran como partícipe de la adquisición y evocación de la memoria durante el condicionamiento aversivo a los sabores, por ejemplo. En el caso de la CmPF no resultó necesaria para nuestro modelo de elección guiada por una memoria gustativa a pesar de la evidencia que sugiere su involucramiento en la toma de decisiones y en la detección de estímulos gustativos. Lo anterior es interesante pues sugiere una especialización y una regulación muy fina del reclutamiento de estructuras necesarias de acuerdo al paradigma bajo el cual son evaluadas.

Bibliografía:

1. Pearson, J. M., Watson, K. K. & Platt, M. L. Decision making: The neuroethological turn. *Neuron* **82**, 950–965 (2014).
2. Rivalan, M., Coutureau, E., Fitoussi, A. & Dellu-Hagedorn, F. Inter-individual decision-making differences in the effects of cingulate, orbitofrontal, and prelimbic cortex lesions in a rat gambling task. *Front. Behav. Neurosci.* **5**, 22 (2011).
3. Gallagher, M., McMahan, R. W. & Schoenbaum, G. Orbitofrontal Cortex and Representation of Incentive Value in Associative Learning. **19**, 6610–6614 (1999).
4. Yamamoto, T. & Ueji, K. Brain mechanisms of flavor learning. *Front. Syst. Neurosci.* **5**, 76 (2011).
5. Núñez-Jaramillo, L., Ramírez-Lugo, L., Herrera-Morales, W. & Miranda, M. I. Taste memory formation: latest advances and challenges. *Behav. Brain Res.* **207**, 232–48 (2010).
6. Bermúdez-Rattoni, F. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 209–17 (2004).
7. de Araujo, I. E. & Simon, S. a. The gustatory cortex and multisensory integration. *Int. J. Obes. (Lond)*. **33 Suppl 2**, S34–43 (2009).
8. Gutierrez, R. & Simon, S. a. Chemosensory processing in the taste - reward pathway. *Flavour Fragr. J.* **26**, 231–238 (2011).
9. Sewards, T. V. Dual separate pathways for sensory and hedonic aspects of taste. *Brain*

Res. Bull. **62**, 271–283 (2004).

10. Samuelsen, C. L., Gardner, M. P. H. & Fontanini, A. Thalamic contribution to cortical processing of taste and expectation. *J. Neurosci.* **33**, 1815–27 (2013).
11. Shi, C. J. & Cassell, M. D. Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *J. Comp. Neurol.* **399**, 440–468 (1998).
12. Karimnamazi, H. & Travers, J. B. Differential projections from gustatory responsive regions of the parabrachial nucleus to the medulla and forebrain. *Brain Res.* **813**, 283–302 (1998).
13. Parabucki, A. & Netser, S. Origin of palatability coding in medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **34**, 4121–2 (2014).
14. Gal-Ben-Ari, S. & Rosenblum, K. Molecular mechanisms underlying memory consolidation of taste information in the cortex. *Front. Behav. Neurosci.* **5**, 87 (2011).
15. Maffei, A., Haley, M. & Fontanini, A. Neural processing of gustatory information in insular circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 709–16 (2012).
16. Allen, G. V, Saper, C. B., Hurley, K. M. & Cechetto, D. F. Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* **311**, 1–16 (1991).
17. Carlos, D., Origin, R., Generation, C. L. & Programmed, W. F. The neural mechanisms of gustation : a distributed processing code. **7**, 1279–1287 (2006).
18. Ramírez-Lugo, L., Zavala-Vega, S. & Bermúdez-Rattoni, F. NMDA and muscarinic receptors of the nucleus accumbens have differential effects on taste memory formation. *Learn. Mem.* **13**, 45–51 (2006).
19. Jezzini, A., Mazzucato, L., La Camera, G. & Fontanini, A. Processing of hedonic and

- chemosensory features of taste in medial prefrontal and insular networks. *J. Neurosci.* **33**, 18966–78 (2013).
20. Group, C. P. Alterations of conditioned taste aversion after microiontophoretically applied neurotoxins in the medial prefrontal cortex of the rat. **53**, 751–758 (2001).
 21. Carleton, A., Accolla, R. & Simon, S. a. Coding in the mammalian gustatory system. *Trends Neurosci.* **33**, 326–34 (2010).
 22. Stalnaker, T. a *et al.* Orbitofrontal neurons infer the value and identity of predicted outcomes. *Nat. Commun.* **5**, 3926 (2014).
 23. Rolls, E. T. & Grabenhorst, F. The orbitofrontal cortex and beyond: from affect to decision-making. *Prog. Neurobiol.* **86**, 216–44 (2008).
 24. Gutierrez, R., Simon, S. a & Nicolelis, M. a L. Licking-induced synchrony in the taste-reward circuit improves cue discrimination during learning. *J. Neurosci.* **30**, 287–303 (2010).
 25. Cooch, N. K. *et al.* Orbitofrontal lesions eliminate signalling of biological significance in cue-responsive ventral striatal neurons. *Nat. Commun.* **6**, 7195 (2015).
 26. MacDonald, C. J., Meck, W. H., Simon, S. a & Nicolelis, M. a L. Taste-guided decisions differentially engage neuronal ensembles across gustatory cortices. *J. Neurosci.* **29**, 11271–82 (2009).
 27. Gutierrez, R., Carmena, J. M., Nicolelis, M. a L. & Simon, S. a. Orbitofrontal ensemble activity monitors licking and distinguishes among natural rewards. *J. Neurophysiol.* **95**, 119–33 (2006).
 28. Sotres-Bayon, F. & Quirk, G. J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr.*

- Opin. Neurobiol.* **20**, 231–5 (2010).
29. Bravo-Rivera, C., Roman-Ortiz, C., Brignoni-Perez, E., Sotres-Bayon, F. & Quirk, G. J. Neural Structures Mediating Expression and Extinction of Platform-Mediated Avoidance. *J. Neurosci.* **34**, 9736–9742 (2014).
 30. Euston, D. R., Gruber, A. J. & McNaughton, B. L. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron* **76**, 1057–70 (2012).
 31. Jonker, F. a, Jonker, C., Scheltens, P. & Scherder, E. J. a. The role of the orbitofrontal cortex in cognition and behavior. *Rev. Neurosci.* 1–11 (2014). doi:10.1515/revneuro-2014-0043
 32. Pickens, C. L. *et al.* Different Roles for Orbitofrontal Cortex and Basolateral Amygdala in a Reinforcer Devaluation Task. **23**, 11078–11084 (2003).
 33. St Onge, J. R. & Floresco, S. B. Prefrontal cortical contribution to risk-based decision making. *Cereb. Cortex* **20**, 1816–28 (2010).
 34. Parkes, S. L. & Balleine, B. W. Incentive memory: evidence the basolateral amygdala encodes and the insular cortex retrieves outcome values to guide choice between goal-directed actions. *J. Neurosci.* **33**, 8753–63 (2013).
 35. Macdonald, C. J., Meck, W. H., Simon, S. A. & Miguel, A. L. Ensembles across Gustatory Cortices. **29**, 11271–11282 (2010).
 36. Welzl, H., D’Adamo, P. & Lipp, H.-P. Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behav. Brain Res.* **125**, 205–213 (2001).
 37. Berman, D. E., Hazvi, S., Neduva, V. & Dudai, Y. The Role of Identified Neurotransmitter Systems in the Response of Insular Cortex to Unfamiliar Taste :

- Activation of ERK1 – 2 and Formation of a Memory Trace. **20**, 7017–7023 (2000).
38. Nú, L., Ramírez-lugo, L., Herrera-morales, W. & Isabel, M. Taste memory formation : Latest advances and challenges. **207**, 232–248 (2010).
 39. Stalnaker, T. a, Cooch, N. K. & Schoenbaum, G. What the orbitofrontal cortex does not do. *Nat. Neurosci.* **18**, 620–627 (2015).
 40. Fellows, L. K. The role of orbitofrontal cortex in decision making: a component process account. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1121**, 421–30 (2007).
 41. Parkes, S. L., Bradfield, L. A. & Balleine, B. W. Interaction of Insular Cortex and Ventral Striatum Mediates the Effect of Incentive Memory on Choice Between Goal-Directed Actions. *J. Neurosci.* **35**, 6464–6471 (2015).
 42. Ramirez-Lugo, L., Nunez-Jaramillo, L. & Bermudez-Rattoni, F. Taste Memory Formation: Role of Nucleus Accumbens. *Chem. Senses* **32**, 93–97 (2007).
 43. Stott, J. J. & Redish, a. D. A functional difference in information processing between orbitofrontal cortex and ventral striatum during decision-making behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369**, 20130472–20130472 (2014).