



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**REGIONES CEREBRALES NECESARIAS PARA
CONDUCTAS DE ELECCIÓN GUIADAS POR ESTÍMULOS
GUSTATIVOS INNATOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ANA JULIETA ORTIZ ALEGRÍA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. FRANCISCO SOTRES BAYÓN**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del alumno

Ortiz
Alegría
Ana Julieta
5529145034
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
308127768

1. Datos del tutor

Dr.
Francisco Xavier
Sotres
Bayón

2. Datos del sinodal 1

Dr.
Federico
Bermúdez
Rattoni

3. Datos del sinodal 2

Dra.
Martha Lilia
Escobar
Rodríguez

4. Datos del sinodal 3

Dra.
Kioko Rubí
Guzmán
Ramos

5. Datos del sinodal 4

QFB
Perla del Rocío
Moreno
Castilla

6. Datos del trabajo escrito

Regiones cerebrales necesarias para conductas de elección guiadas por estímulos
gustativos innatos
69p.
Año 2016

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Francisco Sotres Bayón y la ayuda de la Dra. Leticia Ramírez Lugo en el laboratorio AL 303 de la División de Neurociencias del Departamento de Neuropatología Molecular en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Este 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. IA200313 y No. IA200715 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM) y por el programa “IBRO Return Home Program 2012”.

Durante el desarrollo de esta tesis recibí una beca por parte de Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Por todas las herramientas brindadas para mi formación como ser humano y como bióloga.

A la Dra. Leticia Ramírez Lugo

Por el apoyo incondicional que me has brindado, por ser tan fuerte y enseñarme que no debo rendirme. Gracias por siempre creer en mí y ayudarme en todo momento. Por ser la mejor guía, maestra, colega y consejera. No existen en el mundo palabras suficientes para demostrar lo mucho que te admiro y lo afortunada que soy por contar contigo.

Al Dr. Francisco Sotres

Por abrirme las puertas del laboratorio y enseñarme que con trabajo, esfuerzo y dedicación se pueden conseguir buenos resultados.

A mis sinodales

Dr. Federico Bermúdez Rattoni, Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez, QFB Perla del Rocío Moreno Castilla y Dra. Kioko Rubí Guzmán Ramos, por el tiempo y las aportaciones realizadas a esta tesis.

A la QFB Perla del Rocío Moreno Castilla

Por todo el apoyo técnico y académico para la realización de este proyecto.

A la unidad de cómputo y el taller de mantenimiento del Instituto de Fisiología Celular

Por la ayuda técnica necesaria para la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia

- **Mamá:** Por darme apoyo incondicional y creer siempre en mí. Por el sacrificio y esfuerzo que has hecho para que sea feliz y cumpla mis metas. Te quiero más de lo que las palabras pueden expresar.
- A mis hermanas **Belinda** y **Brenda:** Porque siempre han cuidado de mí con mucho amor y paciencia, me han enseñado que conseguir las cosas puede ser difícil pero jamás imposible. Me han dado los mejores consejos, las mejores palabras de aliento y los mejores momentos de alegría en mi vida. Son el mejor ejemplo e inspiración que cualquiera puede desear. Las quietecito mucho.
- **Tavo:** Por ayudarme a tomar las cosas con calma y preocuparte por mis logros. Por interesarte en mi carrera y tratar de entender las cosas que hago.
- A **Rodo** y **Oscar:** Por los desayunos deliciosos que me han preparado y los consejos que me han dado. Porque creen en mí y en que lo lograré. Por demostrarme que ser un buen ser humano no ser el de mejor calificación y demostrarme que el tiempo es diferente para todos.
- **Nico, Saulito** y **Nati:** Por hacerme reír y lograr que olvide mis miedos, preocupaciones y cansancio. Por los juegos, las risas y ser inspiración para ser mejor cada día.
- **Papá:** Por interesarte en mis estudios, darme palabras de aliento y apoyarme económicamente.

A mis amigas y amigos

- **Eli:** Por los momentos, buenos y malos, que hemos vivido juntas. Por ayudarme con mis bebederos y siempre recibirme en tu cuartito. Por ser incondicional y ser una persona excepcional.

- **Pato (María):** Por reír y llorar juntas, por darme consejos y palabras para salir adelante. Por ser honesta, leal, confiable y divertida. Por tu incondicional apoyo.
- **Zelt:** Por recorrer juntas las aulas y ser siempre el mejor equipo de trabajo. Por siempre escucharme, comprenderme, confiar en mí. Gracias por acompañarme al final de todo y darme los ánimos que muchas veces me hicieron falta.
- A mis adorados **Asnos** (Pink ladies), mis incondicionales **Ridículas**, mis chicos **Prepa 9 Danza** y mis **Amistades Largas**: Por apoyarme y creer en mí. Por darme los momentos más divertidos y únicos de mi vida. Porque cada experiencia, baile, abrazo, risa, burla, plática, queja y sugerencia hacen más alegres mis días.

ÍNDICE

RESUMEN	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Sistema gustativo	14
1.2 Corteza Orbitofrontal	15
1.2.1 La corteza gustativa secundaria en la ingesta de estímulos gustativos	16
1.2.2 La corteza orbitofrontal en las decisiones gustativas.....	17
1.3 Corteza Insular.....	18
1.3.1 La corteza insular y la memoria gustativa.....	19
1.3.2 La corteza gustativa primaria responde a distintos estímulos gustativos	20
1.4 Núcleo accumbens.....	21
1.4.1 Integración entre motivación y acción motora.....	22
1.5 Tálamo gustativo.....	23
1.5.1 El tálamo gustativo responde al consumo de diferentes estímulos gustativos	24
1.6 Núcleo del tracto solitario	25
1.6.1 El núcleo del tracto solitario en respuesta a la ingesta de diferentes estímulos gustativos	26
1.7 Integración de la información gustativa	27
JUSTIFICACIÓN.....	30
OBJETIVOS	30
HIPÓTESIS	31
MATERIAL Y MÉTODO	32
5.1 Animales	32
5.2 Cirugía	32
5.3 Protocolo conductual.....	33
5.3.1 Línea base.....	34
5.3.2 Pruebas.....	34
5.4 Desactivación farmacológica temporal	34

5.5	Perfusión e histología.....	36
5.6	Análisis de datos	37
RESULTADOS		39
6.1	Estandarización del protocolo conductual	39
6.2	La desactivación farmacológica temporal de la COF no afecta la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos	44
6.3	La desactivación farmacológica temporal de la CI no afecta la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos	46
6.4	La desactivación farmacológica temporal de la NAcc no afecta la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos	49
6.5	La desactivación farmacológica temporal del tálamo gustativo no afecta la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos	51
6.6	La desactivación farmacológica temporal del NTS no afecta la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos	53
DISCUSIÓN.....		56
7.1	Áreas corticales: orbitofrontal e insular	56
7.2	Áreas subcorticales: núcleo accumbens y tálamo	58
7.3	Núcleo del tracto solitario	60
7.4	Las elecciones gustativas innatas como un sistema integrado	61
7.5	La correlación de actividad eléctrica neuronal y conducta no implica causalidad	62
CONCLUSIÓN.....		64
REFERENCIAS		65

RESUMEN

Elegir entre alimentos peligrosos y seguros es crucial para la supervivencia de los seres vivos. Se ha visto que la mayoría de los animales tienen de manera innata una preferencia por los alimentos con sabor dulce porque suelen indicar la presencia de calorías, y una aversión por los alimentos con sabor amargo, que pueden señalar que la comida es tóxica (van den Bosch et al., 2014). Por lo tanto, un animal que se enfrenta a una variedad de alimentos con sabor dulce y otros amargos, elegirá a los dulces sobre los amargos.

Una aproximación para el estudio de la elección de sabores que son preferidos o rechazados de manera innata es evaluar aquellas estructuras que participan en el procesamiento de la información gustativa. En este sentido, a través de trabajos de electrofisiología, se han reportado regiones cerebrales que poseen un porcentaje de neuronas que responden a diversos sabores. Por ejemplo, en el núcleo del tracto solitario se ha observado que el mayor porcentaje de neuronas registradas responden cuando se consume un alimento con sabor amargo (Chen & Di Lorenzo, 2008); mientras que, en el tálamo (Samuelsen, Gardner, & Fontanini, 2013), el núcleo accumbens (Roitman, Wheeler, Tiesinga, Roitman, & Carelli, 2010), la corteza insular (Stapleton, Lavine, Wolpert, Nicolelis, & Simon, 2006) y la corteza orbitofrontal (Pritchard et al., 2005) hay un mayor porcentaje de neuronas que responden cuando se consume un alimento con sabor dulce. Considerando que estas regiones cerebrales aportan información sobre el procesamiento gustativo y que algunas de ellas participan al momento de elegir o no un alimento asociado a una experiencia previa (L. Ramírez-Lugo, 2014), se puede considerar a estas regiones como candidatas para conductas de elección guiadas por estímulos gustativos innatos.

Por lo tanto, mediante inactivaciones farmacológicas temporales se buscaron las regiones cerebrales necesarias en las elecciones de carácter innato y se encontró que ninguna participa en las elecciones gustativas innatas.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAS	Condicionamiento de aversión a sabores
CI	Corteza insular
CIA	Corteza insular agranular
CID	Corteza insular disgranular
CIG	Corteza insular granular
COF	Corteza orbitofrontal
COFI	Corteza orbitofrontal lateral
COFm	Corteza orbitofrontal medial
COFv	Corteza orbitofrontal ventral
M&B	Muscimol y baclofeno
NAcc	Núcleo accumbens
NC	Nervios craneales
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPb	Núcleo parabraquial
NTS	Núcleo del tracto solitario
NTSc	Núcleo del tracto solitario caudal
NTSr	Núcleo del tracto solitario rostral
PBA	Prueba
Q	Quinina
S	Sacarina
TTX	Tetradoxina
VM	Núcleo ventromedial de tálamo
VPL	Núcleo ventral posterolateral del tálamo
VPM	Núcleo ventroposterior medial del tálamo
VPP	Región parvicelular del núcleo ventroposterior del tálamo

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Regiones cerebrales que forman parte del sistema gustativo
- Figura 2.** Corteza orbitofrontal
- Figura 3.** Corteza Insular
- Figura 4.** Núcleo accumbens
- Figura 5.** Tálamo
- Figura 6.** Núcleo del tracto solitario
- Figura 7.** Regiones cerebrales relevantes en las elecciones gustativas innatas
- Figura 8.** Representación de la prueba conductual después de la desactivación farmacológica
- Figura 9.** Protocolo conductual
- Figura 10.** Concentraciones de sacarina
- Figura 11.** Concentraciones de quinina
- Figura 12** Concentración de sacarina y quinina
- Figura 13** Desactivación farmacológica de la corteza orbitofrontal
- Figura 14** Desactivación farmacológica de la corteza insular
- Figura 15** Desactivación farmacológica del núcleo accumbens
- Figura 16** Desactivación farmacológica del tálamo gustativo
- Figura 17** Desactivación farmacológica del tallo cerebral gustativo
- Tabla 1.** Coordenadas utilizadas para la canulación de los animales

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, los seres vivos se enfrentan a elecciones que determinan su supervivencia como es la elección de pareja, el sitio adecuado para el cuidado de crías y la selección de alimentos, entre otras. Una elección se puede considerar como la selección de una alternativa dentro de un rango de opciones existentes, considerando los posibles resultados de las selecciones realizadas y sus consecuencias en el comportamiento presente y futuro de un individuo (Broche-Perez, Herrera Jimenez, & Omar-Martinez, 2015). Para ello, se ponen en juego numerosos procesos cognitivos, como el procesamiento de los estímulos presentes en la tarea, el recuerdo de experiencias previas y la estimación de las posibles consecuencias de cada una de las opciones disponibles. En conjunto, todos estos procesos requieren la implicación de la memoria y de las funciones ejecutivas (Martinez-Selva, Sanchez-Navarro, Bechara, & Roman, 2006).

En general, las elecciones pueden estar influenciadas por las características de los estímulos: aquellos de los que se ha aprendido algo y aquellos estímulos que de manera innata generan una preferencia o una aversión. En las elecciones que son influenciadas por el aprendizaje, los individuos eligen a partir de experiencias previas al seleccionar la opción que le aportará mayores beneficios. Este tipo de elecciones han sido ampliamente estudiadas. Por ejemplo, en conductas de costo-beneficio, los animales al elegir entre recompensas inmediatas y pequeñas y recompensas retrasadas y grandes, se ha observado que los animales prefieren las primeras respecto a las segundas (Rudebeck, Walton, Smyth, Bannerman, & Rushworth, 2006). En otros experimentos, se utilizan señales como indicadores para que los animales lleven a cabo una elección, a través de una señal de luz y sonido los animales tienen que elegir entre cruzar una parrilla electrificada y obtener comida o no cruzar la reja y no recibir alimento (Illescas Huerta, 2015).

Por otro lado, en las elecciones motivadas por estímulos innatos, los animales eligen a partir de una preferencia o rechazo por las características naturales de los estímulos (Reilly & Pritchard, 1996). Un ejemplo de ello es el forrajeo, esta conducta consiste en que el individuo debe elegir entre dos lugares en los que puede encontrar alimento, así que el animal deberá dirigirse a alguno de los sitios sin tener señales que le indiquen por cuál de ellos optar o cuál de ellos es mejor. Pese a la importancia de las elecciones de carácter innato no se han establecido más modelos conductuales que permitan su estudio y por tal, la información que se conoce es limitada dejando así, un amplio campo de estudio disponible.

Una forma de aproximarse al estudio de estas elecciones es a través del sistema gustativo ya que se tiene bien descrito el procesamiento de la información gustativa. El sistema gustativo permite detectar y discriminar entre comidas para seleccionar dietas nutritivas, así como, iniciar, sustentar y terminar la ingesta con el propósito de mantener el balance energético (Pandurangan & Hwang, 2015). También se ha observado que aporta información acerca de la apariencia, familiaridad, olor, textura, temperatura y los efectos post- ingesta de los alimentos (Simon, de Araujo, Gutierrez, & Nicoletis, 2006). Toda la información en conjunto permite seleccionar, de entre una variedad de alimentos, aquellos que favorezcan al individuo. En este sentido, se ha observado que los animales tienen preferencia innata por los alimentos con sabor dulce, probablemente porque suelen indicar la presencia de calorías. Por el contrario, de manera natural, existe una aversión por los alimentos con sabor amargo, posiblemente porque suelen indicar que la comida contiene toxinas (van den Bosch et al., 2014).

Dado que las elecciones que involucran estímulos gustativos afectan la salud y la supervivencia de los seres vivos y que el sistema gustativo está conformado por áreas cerebrales que aportan información quimiosensorial (modalidad, intensidad), orosensorial (textura, temperatura, irritabilidad) y la de recompensa proveniente de los alimentos (Carleton, Accolla, & Simon, 2010), es posible estudiar si alguna de las regiones cerebrales que lo integran participa en las elecciones gustativas

innatas. Por lo tanto, un animal que se enfrenta a una variedad de alimentos por primera vez, algunos con sabor dulce y otros con sabor amargo, preferirá consumir los alimentos dulces y rechazará los amargos.

1.1 Sistema gustativo

El sistema gustativo está conformado por distintas regiones cerebrales que procesan la información procedente de los alimentos. La información que proviene de los receptores gustativos es llevada a través de los nervios craneales (NC) VII, IX y X, hacia el núcleo del tracto solitario (NTS) que es el principal núcleo de integración para la información visceral y sensorial. La siguiente estructura en procesar la información gustativa es el tálamo, específicamente en la región ventroposteromedial (VPM) que es conocida como la región gustativa. Las proyecciones del tálamo pasan a la corteza insular (CI), en la que existe evidencia sobre la integración del sabor. Finalmente de la CI la información llega a la corteza orbitofrontal (COF) en la que la información termina de ser procesada y se emite una respuesta motora para continuar con la ingesta del alimento (Simon et al., 2006). En la figura 1 se observa un resumen de algunas de las regiones que forman parte del sistema gustativo.

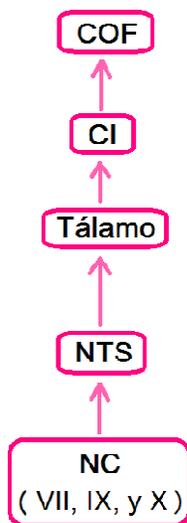


Figura 1. Regiones cerebrales que forman parte del sistema gustativo. Se muestran algunas de las regiones cerebrales que procesan la información gustativa que es llevada a través de los nervios craneales (NC) al núcleo del tracto solitario (NTS) de ahí la información se envía al tálamo gustativo el que al momento de recibirla y procesarla la envía a la corteza insular (CI) y después a la corteza orbitofrontal (COF).

Es importante hacer notar que las regiones cerebrales del sistema gustativo no son las únicas que se encargan de procesar la información que proviene de los alimentos, algunas regiones como la COF y el núcleo accumbens (NAcc) además de pertenecer al sistema gustativo también forman parte del sistema motivacional. En conjunto ambos sistemas permiten a los animales elegir, de las opciones disponibles, la más conveniente.

A continuación se hará la descripción de las estructuras que por sus características, en cuanto a procesamiento de información, pueden ser buenas candidatas para explorar su papel en las elecciones que son guiadas por la respuesta innata de los sujetos a los estímulos gustativos presentados. La primera estructura será la COF, ya que esta región cerebral tiene una participación importante en el procesamiento gustativo además de, participar en las elecciones que llevan de por medio un aprendizaje.

1.2 Corteza orbitofrontal

La corteza orbitofrontal es una región cerebral que participa en el sistema encargado del procesamiento de la información proveniente de los alimentos (Zald, 2009). Esta región cerebral forma parte de la corteza prefrontal, se extiende a través de la superficie del polo rostral y consiste en la corteza orbitofrontal medial, orbitofrontal ventral, orbitofrontal lateral y orbitofrontal dorsolateral como se observa en la figura 2 (Van De Werd & Uylings, 2008).

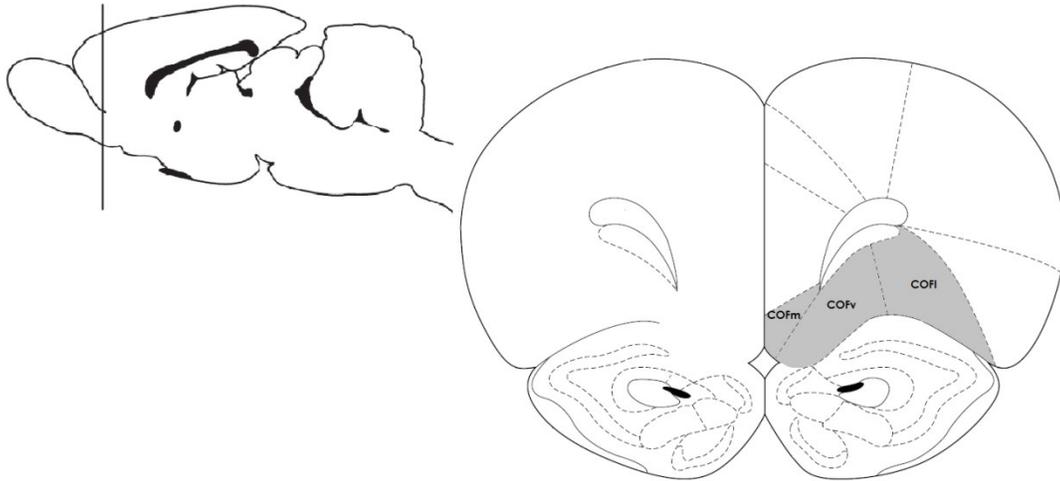


Figura 2. Corteza orbitofrontal; superior izquierda, se muestra el diagrama sagital de la COF. Inferior derecha, se muestra el corte coronal de la COF. Se observan algunas de las subdivisiones anatómicas de la estructura como son la corteza orbitofrontal medial (COFm), ventral (COFv) y orbitofrontal lateral (COFl).

La COF posee importantes conexiones con otras estructuras como la corteza prefrontal dorsolateral y la corteza cingulada anterior. Además, tiene una elevada conectividad con la amígdala y el hipocampo, contribuyendo de manera importante al procesamiento emocional (Barbas, 2007). En ella se encuentran las cortezas olfativas donde se representa la identidad y el valor de una recompensa de carácter olfativo (Rolls, 2015), es decir qué tan benéfico puede ser un olor para el organismo. En general, participa en la integración de información que proviene de los diferentes sentidos, como son la vista, el olfato y el gusto.

1.2.1 La corteza gustativa secundaria en la ingesta de estímulos gustativos

Se ha visto a través de estudios de electrofisiología que las neuronas de esta región responden ante la ingesta de sabores dulces, amargos, salados y ácidos. En un experimento de electrofisiología se administraron cuatro sabores a través de cánulas intraorales y se observó que el porcentaje de neuronas sensibles a estímulos dulces rebasa ligeramente el 50% mientras que, las que responden a sabores salados y amargos alcanzan el 43 y 40% respectivamente. El porcentaje

de neuronas sensibles a sabores ácidos alcanzan el 56%. En general, se observa que en la COF hay una mayor proporción de neuronas que responden ante la ingesta de sabores dulces en comparación con la proporción de neuronas que responden cuando se ingiere un sabor amargo (Pritchard et al., 2005). Por lo tanto, la COF responde más ante la ingesta de sabores dulces que amargos.

1.2.2 La corteza orbitofrontal en las decisiones gustativas

Con respecto al sentido del gusto, la COF es conocida como la corteza gustativa secundaria ya que tiene importantes conexiones que le permiten recibir impulsos directos de la corteza insular (Rolls, 1989) además, se involucra en el aprendizaje y las asociaciones estímulo respuesta (Rolls, 1996) es decir, participa en aquellas elecciones que implican experiencias previas y en las situaciones que implican enviar una señal y en base a esa señal emitir una respuesta determinada. Es por ello que esta región cerebral tiene un rol crucial en la evaluación del procesamiento gustativo, ya que provee el principal punto de partida para entender los aspectos neuronales de la selección de alimentos.

Varios factores que codifican e integran la información en la COF, pueden influir en la capacidad de los individuos para adoptar y mantener una dieta saludable que les permita sobrevivir (Zald, 2009). Un ejemplo es su participación en la evaluación de recompensas asociadas a reforzadores primarios como es el sabor. En estos experimentos el individuo ve un estímulo visual que se asocia con la entrega de un sabor dulce, esta asociación directa entre el estímulo visual y el reforzador primario es esencial para el aprendizaje. Ejemplo de lo anterior es la asociación de la imagen de un objeto y su sabor y se ha observado que el daño en la COF impide que el individuo lleve a cabo estas asociaciones. De tal manera que se ha observado una deficiencia en las conductas de elección entre diferentes reforzadores positivos, al evitar la ingesta de una dieta variada con consecuencias nutricionales benéficas (Rolls & Grabenhorst, 2008). También se ha relacionado a la COF con la adaptación a cambios rápidos en contingencias de recompensa y

respuestas de supresión a estímulos, estas actividades son críticas en las decisiones bajo presión y en la modificación en el arreglo de opciones que se presentan a un individuo. De manera general, una propiedad de la COF es inhibir las respuestas motoras y modificar el comportamiento de acuerdo con el cambio en las contingencias ambientales (Krawczyk, 2002). Por otro lado, también se ha demostrado la participación de la COF en la toma de decisiones con experiencias gustativas previas, donde se ha visto que el daño de la COF modifica la ingesta de alimentos y la conducta futura de los individuos (Rolls & Grabenhorst, 2008).

Por lo tanto, la COF es una región que pertenece al sistema gustativo en la que sus poblaciones celulares responden ante la ingesta de múltiples estímulos gustativos y que participa en aspectos de la toma de decisiones como la evaluación de recompensas a reforzadores primarios, la adaptación a cambios rápidos entre opciones, la selección entre múltiples opciones y la elección de alimentos en base a experiencias previas. Lo anteriormente descrito sugiere a la COF en una región candidata necesaria en las elecciones guiadas por estímulos gustativos innatos.

1.3 Corteza insular

La COF tiene importantes conexiones con la corteza insular (CI), que es conocida como la corteza gustativa primaria (Small, 2012). La CI se ubica en la superficie lateral del cerebro, dentro de la cisura de Silvio (surco lateral). Las conexiones anatómicas de la CI sugieren que esta región cerebral juega un rol importante en la integración y posible almacenamiento de la información visceral (Van De Werd & Uylings, 2008). La CI se define como un área que abarca de la parte lateral de la corteza perirrinal hasta el borde ventral de la corteza somatomotora de la corteza periforme (Saper, 1982). La CI recibe información gustativa del tálamo que llega de manera específica a la región granular y disgranular (ver figura 3), en las que hay evidencia sobre la integración, los impulsos táctiles y olfativos que provienen del sabor (Small, 2012).

Esta región cerebral se involucra en el procesamiento de la información gustativa, sobre todo en procesos complejos como la intensidad con la que se percibe un estímulo gustativo, las propiedades no químicas, la palatabilidad y la memoria gustativa (Accolla, Bathellier, Petersen, & Carleton, 2007).

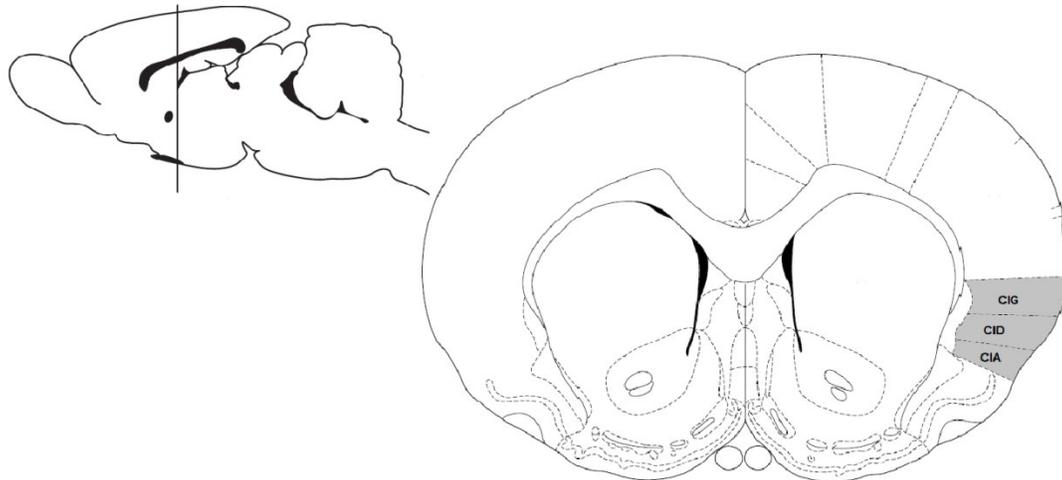


Figura 3. Corteza insular; superior izquierda, se muestra el diagrama sagital de la CI. Inferior derecha, se muestra el corte coronal de la CI. Se observa la corteza insular granular (CIG), disgranular (CID) y agranular (CIA).

1.3.1 La corteza insular y la memoria gustativa

La memoria gustativa es uno de los aspectos más estudiados de la CI. La memoria gustativa incluye el reconocimiento de un sabor así como sus características relacionadas con el valor hedónico, el nivel de familiaridad, y las propiedades nutritivas o tóxicas que se asocian con el sabor, por ejemplo los animales muestran un bajo consumo y una respuesta neofóbica cuando consumen un sabor nuevo. Cuando el sabor deja de ser novedoso los animales aumentan el consumo y se sacian si el sabor fue reconocido como seguro en la presentación anterior, mientras que, los animales rechazan o disminuyen el consumo del sabor si la comida produjo un malestar gástrico posterior a la ingesta (Pandurangan & Hwang, 2015). De tal manera que, en términos de adaptación evolutiva, la memoria gustativa es necesaria para la apropiada identificación de los nutrientes

disponibles en la comida y, por supuesto, es esencial para evitar toxinas mortales. La memoria gustativa ha sido estudiada mediante el uso de distintas herramientas, una de ellas es el condicionamiento de aversión a sabores (CAS). En el CAS un sabor nuevo para el animal es asociado con consecuencias gástricas negativas posteriores a su ingesta y como resultado de la asociación en presentaciones subsecuentes el animal evitará el consumo del nuevo sabor. Utilizando este condicionamiento se ha visto que la memoria gustativa se ve afectada si se realizan desactivaciones temporales con TTX (neurotoxina que impide los potenciales de acción a través del bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje), lesiones electrolíticas o excitotóxicas en la adquisición y la recuperación de la memoria gustativa (Nunez-Jaramillo, Ramirez-Lugo, Herrera-Morales, & Miranda, 2010). Por lo tanto, la CI tiene un rol crucial que puede ser relacionado de manera directa con la supervivencia del organismo.

1.3.2 La corteza gustativa primaria responde a distintos estímulos gustativos

En estudios de electrofisiología se ha visto que las neuronas de la CI responden a la presentación de estímulos gustativos y se obtuvo el porcentaje de células que responden a diferentes sabores: salado, amargo, ácido, dulce. Se observó que 82.8% de las células responden al sabor salado, 91.5% al dulce, 83.8% y 61.1% responden al sabor ácido y amargo respectivamente (Stapleton et al., 2006). El porcentaje de células que responden al sabor dulce es mayor que el del sabor amargo, lo que sugiere que en la CI las células tienen una mayor participación en el reconocimiento y procesamiento de la información que proviene de sabores dulces.

Adicionalmente la CI que es conocida como la corteza gustativa primaria, cumple un rol importante en el procesamiento de la información y se ha observado que en esta región las neuronas responden principalmente a los estímulos gustativos de sabor amargo. Por lo tanto, la CI puede participar en las conductas de elección

gustativa innata por la participación que tiene en el procesamiento de la información gustativa y la respuesta que tienen sus poblaciones celulares ante la ingesta de distintos estímulos gustativos.

1.4 Núcleo accumbens

El NAcc se encuentra en la parte rostrbasal del cerebro anterior, se subdivide en dos regiones: core y shell como se observa en la figura 4. El NAcc shell proyecta a la parte media del pálido ventral, el hipotálamo lateral, el área ventral tegmental, el núcleo parabraquial y la sustancia negra pars compacta; por otro lado, el NAcc core proyecta hacia la parte dorsoventral del pálido ventral, el núcleo entopenduncular y la sustancia negra pars compacta (Zahm & Heimer, 1993).

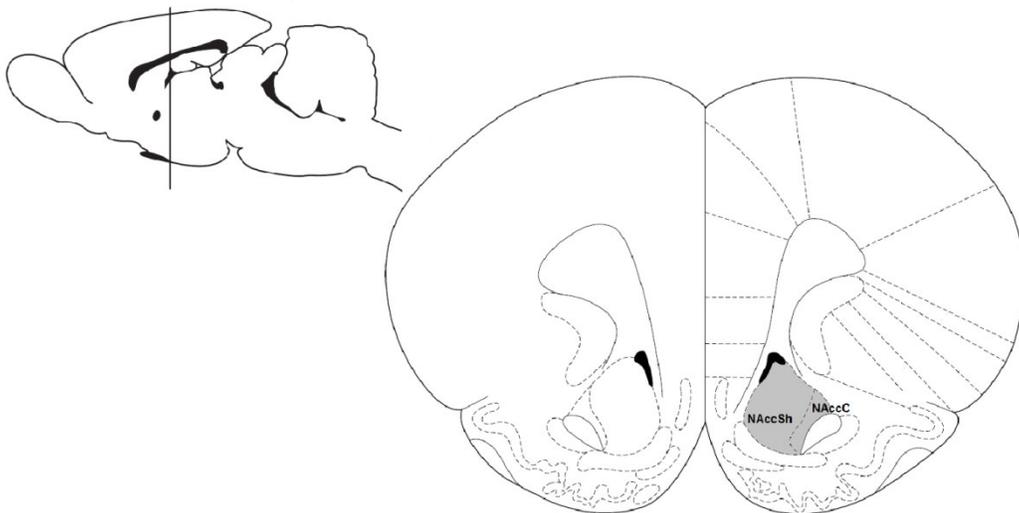


Figura 4. Núcleo accumbens; superior izquierda, se muestra el diagrama sagital del NAcc. Inferior derecha, se muestra el corte coronal del NAcc. Se observa el núcleo accumbens shell (NAccSh) y núcleo accumbens core (NAccC).

Se ha observado que el NAcc participa en la formación de la memoria gustativa de aversión porque hay un aumento en la liberación de acetil colina cuando se asocia

el cloruro de litio con la sacarina en el CAS (Mark, Weinberg, Rada, & Hoebel, 1995) así como, la participación de los receptores NMDA en la formación del CAS (Fenu, Bassareo, & Di Chiara, 2001).

A esta región cerebral se le atribuye la capacidad de dar el valor hedónico a lo que se consume es decir, cuando se ingiere un alimento o bebida y se discrimina la calidad por medio de una variedad de sensaciones que permiten etiquetarla como algo apetitivo o aversivo, se pone en marcha el NAcc. Si el valor hedónico que produce un alimento es apetitivo, la ingesta del alimento causará una sensación de placer y gusto en el organismo provocando que el consumo del alimento aumente convirtiendo el alimento en un reforzador (Salamone & Correa, 2002).

1.4.1 Integración entre motivación y acción motora

El núcleo accumbens está involucrado en la integración entre motivación y acción motora. Numerosos estudios han resaltado su destacado papel en las respuestas motoras tras el contacto con estímulos apetitivos y aversivos. Es evidente que su principal papel es transferir información motivacional para que se codifiquen actos motores es decir, reconocer situaciones de importancia adaptativa para que el animal desarrolle una conducta motora apropiada (Fernández-Espejo, 2000). La motivación se suele definir como el conjunto de procesos a través de los cuales los organismos regulan la probabilidad, la proximidad y la disponibilidad de estímulos significativos (Domjan, 2007). Los organismos frecuentemente separan los estímulos significativos del ambiente, como son, la comida y el agua, y como requisito estos deben superar los “costos” para acceder a estos estímulos (Nunes, Randall, Podurriel, Correa, & Salamone, 2013).

Como se ha visto el NAcc no es considerado como una estructura que forme parte del sistema gustativo sin embargo, su participación en otros sistemas lo convierte en una estructura clave para la ingesta de alimentos y las elecciones de carácter gustativo.

1.5 Tálamo gustativo

Antes de que la información gustativa llegue a las cortezas cerebrales, esta información es procesada y recibida en el tálamo. El tálamo gustativo es una región gustativa esencial que transmite información sensorial del cerebro posterior al cerebro anterior (Reilly, 1998). También es conocido por ser la principal fuente de información procedente de los alimentos para la CI ya que envía información sobre las características físicas y químicas de los estímulos gustativos (Samuelsen et al., 2013). Además, se ha observado que cuenta con células que responden exclusivamente a la estimulación química de la cavidad oral y que son sensibles a estímulos gustativos (Small, 2012).

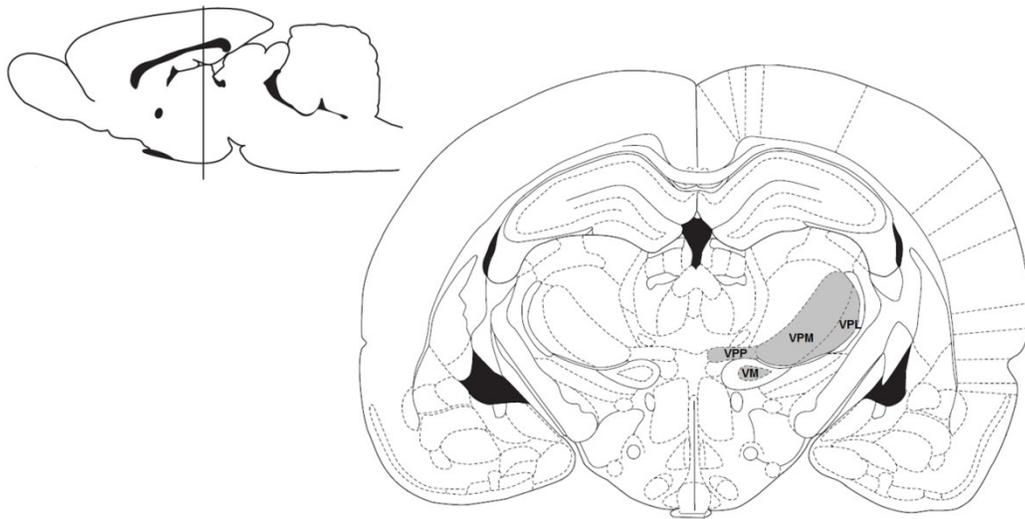


Figura 5. Tálamo; superior izquierda, se muestra el diagrama sagital del tálamo. Inferior derecha, se muestra el corte coronal del tálamo. Se observa el núcleo ventral posterolateral del tálamo (VPL), el núcleo ventral posteromedial de tálamo (VPM), la región parvicelular del núcleo ventroposterior del tálamo (VPP) y el núcleo ventromedial de tálamo (VM).

De manera específica, la porción parvicelular del núcleo ventroposteromedial del tálamo (ver figura 5) juega un rol crucial para el procesamiento y retransmisión de la información gustativa. Lo anterior se ha sugerido porque se ha observado que las neuronas del tálamo de animales en alerta responden a la expectación de un

sabor antes y después de desactivaciones farmacológicas temporales con agonistas GABA (muscimol). Como resultado se ha encontrado que su desactivación altera el estado general de la corteza gustativa primaria y modifica de manera dramática la habilidad de los organismos para procesar la información cuando se suministran alimentos sin señales previas, es decir cuando hay un procesamiento de carácter innato (Samuelsen et al., 2013).

El tálamo gustativo recibe proyecciones de núcleo del tracto solitario, específicamente de la zona caudal (Cho, Mao, & Li, 2008). También recibe información de la parte medial del núcleo parabraquial (zona gustativa) que proyecta a la parte parvicelular del núcleo medial posterior del tálamo y la porción más lateral del núcleo parabraquial proyecta hacia la parte parvicelular del núcleo lateral posterior ventral. También se ha observado que el tálamo tiene importantes conexiones con la corteza gustativa primaria (CI) ya que a través de esta conexión la información gustativa llega a esta corteza cerebral de manera directa, sin tener ningún relevo entre ambas regiones gustativas (Bures, Bermudez-Rattoni, & Yamamoto, 1998).

1.5.1 El tálamo gustativo responde al consumo de diferentes estímulos gustativos

Debido a la importante participación del tálamo en el procesamiento de la información gustativa se han realizado experimentos de electrofisiología que han mostrado que las neuronas del tálamo responden a distintos estímulos gustativos. Utilizando cuatro sabores (sacarosa, quinina, cloruro de sodio y ácido cítrico) administrados de manera individual a través de cánulas intraorales. Se observó que una mayor proporción de células responde a quinina y cloruro de sodio, posteriormente se llevó a cabo una desactivación farmacológica, donde se observó que al ser desactivado el tálamo, la proporción de células que responden a los sabores disminuye de manera importante. Por lo tanto, las células del tálamo responden ante el consumo de distintos sabores pero en proporciones diferentes

(Samuelsen et al., 2013) siendo mayor la respuesta a estímulos amargos. Por otra parte su desactivación modifica la capacidad de respuesta de sus células ante el consumo de distintos estímulos gustativos.

Como se mencionó anteriormente, el tálamo gustativo es el segundo relevo en el paso de la información gustativa y es reconocido como la principal fuente de información acerca de las características físicas y químicas de los estímulos gustativos. Si se considera la respuesta de sus poblaciones celulares ante la ingesta de determinados estímulos lo convierte en una región candidata en las elecciones gustativas de carácter innato.

1.6 Núcleo del tracto solitario

Las estructuras anteriormente mencionadas son algunas de las regiones corticales y subcorticales que participan en aspectos que se relacionan con el procesamiento gustativo. Sin embargo se ha visto que hay regiones cerebrales que se localizan en el tallo cerebral, que también son importantes en el procesamiento de la información gustativa. El primer paso de la información gustativa hacia el cerebro es el núcleo del tracto solitario.

El NTS recibe información visceral de las diferentes ramas del nervio vago, así como del área postrema y del sistema vestibular. Esta entrada de información termina en el área caudal del NTS. El NTS también recibe aferencias gustativas primarias de la lengua a través de los nervios craneales VII y IX, y de la faringe y laringe a través del nervio X. Las neuronas gustativas del NTS se localizan en la parte rostral del NTS (zona gustativa) que proyecta a la parte medial del núcleo parabraquial (Bures et al., 1998). La porción rostral (NTSr) recibe la información gustativa proveniente de la cavidad oral y lleva la información al siguiente eslabón del sistema gustativo que es el Núcleo Parabraquial (NPb) o a la región ventroposterior medial (VPM) del Tálamo, mientras que la porción caudal (NTSc)

se encarga de transmitir la información fisiológica que proviene del sistema gastrointestinal. En conjunto, el NTS integra la información somatosensorial y gastrointestinal proveniente de los alimentos (Simon et al., 2006).

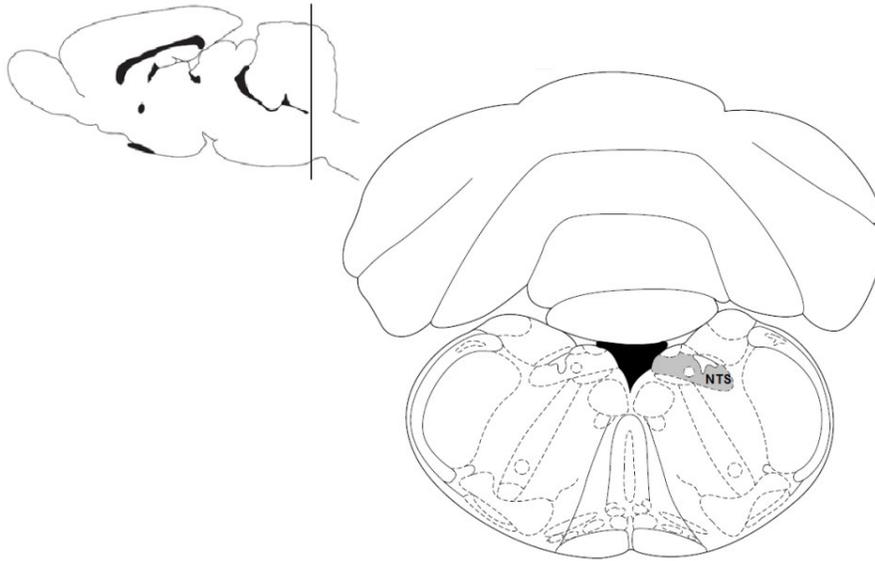


Figura 6. Núcleo del tracto solitario; superior izquierda, se muestra el diagrama sagital del NTS. Inferior derecha se muestra el corte coronal del NTS.

1.6.1 El núcleo del tracto solitario en respuesta a la ingesta de diferentes estímulos gustativos

Se ha observado que las neuronas del tallo cerebral responden a la ingesta de estímulos gustativos de manera más robusta que las neuronas de las regiones corticales; se ha sugerido que esto sucede porque las neuronas corticales participan de manera breve en el procesamiento de los estímulos, y después invierten su energía en la transformación de un estímulo en una respuesta generada en base a experiencias previas (Katz, 2005), por lo que el NTS tiene un papel de vital importancia en la percepción de los sabores.

De manera específica se han realizado estudios de electrofisiología en el NTS que han mostrado cómo cambia la tasa de disparos de las células de acuerdo al sabor que ingiere un animal. Se utilizaron repetidamente cuatro estímulos gustativos que

representan cuatro cualidades básicas del sabor que son dulce (sacarosa), amargo (quinina), salado (NaCl) y ácido (ácido cítrico) y se registraron las respuestas electrofisiológicas de células individuales. Se observó que para todos los sabores las células del NTS respondían a los cuatro sabores que fueron administrados y que, durante los primeros cuatro segundos las tasas de disparo de las células aumentaban y al pasar este tiempo las tasas de disparo disminuían significativamente (Di Lorenzo & Victor, 2003).

Como se mencionó anteriormente, el NTS es el primer relevo para el paso de la información gustativa y es el punto de llegada de la información para que comience a ser procesada por el cerebro. Como parte de este inicio en el procesamiento se ha observado que las células del NTS responden ante la ingesta de estímulos gustativos, y que esta respuesta va disminuyendo conforme el paso del tiempo, haciendo que sea mayor casi al instante de consumir estímulos. En base a esta información es posible considerar al NTS como una región que se encarga de las elecciones gustativas innatas.

Previamente, se han descrito algunas regiones cerebrales que son importantes en la toma de decisiones y el procesamiento de la información gustativa. Para la realización de esta tesis, es importante conocer cómo es que la información es procesada en el cerebro; para ello se describirá cómo se ha sugerido que se lleva a cabo el paso de la información a través del cerebro.

1.7 Integración de la información gustativa

Anteriormente se describieron algunas regiones que forman parte del sistema gustativo y que además, participan en las elecciones. El sistema gustativo ha evolucionado para detectar y discriminar entre comidas, seleccionar dietas nutritivas, y para iniciar, mantener y terminar la ingesta de alimentos. Estos procesos duran varios segundos e involucran la integración de múltiples recursos de información (Katz, Nicolelis, & Simon, 2002). Debido a las múltiples funciones

que son necesarias para el procesamiento gustativo se ha estudiado cómo es que la información pasa a través de las diferentes estructuras cerebrales.

Gracias a lo anterior, se han sugerido diversas formas que tratan de explicar cómo se procesa la información gustativa. La primera de ellas se le denomina etiquetado lineal, en ella se sugiere que la información se procesa de manera ordenada a través de las estructuras cerebrales, es decir que la información va pasando de manera secuencial de una estructura a otra. Por lo que se propone que un estímulo de un determinado sabor y calidad es codificado por células que responden preferentemente a ese estímulo, teniendo como consecuencia que el procesamiento de la información sea en una sola dirección (Di Lorenzo & Victor, 2003). La segunda forma se denomina patrón neuronal cruzado, es relativamente reciente y sugiere que la información gustativa no pasa de manera ordenada a las estructuras cerebrales, sino que puede pasar de una estructura a otra sin un orden específico e incluso ser procesada al mismo tiempo en distintas regiones cerebrales y que esto se debe a que las respuestas específicas forman un ciclo de información en un sistema interconectado (Katz et al., 2002).

1.8 Regiones cerebrales para el estudio de las elecciones guiadas por estímulos gustativos innatos

Para las elecciones guiadas por estímulos gustativos innatos fueron consideradas las regiones cerebrales que ayudan y participan de alguna manera en las decisiones o en el procesamiento de la información gustativa. A nivel del tallo cerebral el NTS es el primer relevo de la información gustativa ya que ahí llega la información de los NC; a nivel subcortical se ha visto que el Tálamo gustativo y el NAcc juegan papeles cruciales, el primero es el segundo relevo de información y además se ha visto que sus células responden ante la ingesta de estímulos gustativos; el segundo, se ha involucrado con la motivación para ingerir algún alimento así como su participación en el procesamiento de estímulos positivos y negativos; a nivel cortical se han relacionado a las CI y COF con la toma de

decisiones, la primera por su participación en la memoria gustativa y la segunda como corteza motora una vez que se lleva a cabo una elección.

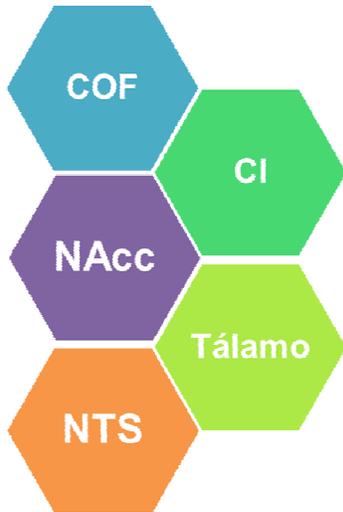


Figura 7. Regiones cerebrales relevantes en las elecciones gustativas innatas. Algunas regiones cerebrales se consideran por formar parte del sistema gustativo y ayudar al procesamiento de la información gustativa como son: NTS, tálamo gustativo, CI y COF. El NAcc además de ser importante en el proceso gustativo también es considerado en este tipo de elecciones debido a su participación con las recompensas y el valor hedónico. NTS: núcleo del tracto solitario; CI: corteza insular; COF: corteza orbitofrontal; Nacc: núcleo accumbens.

Dado que la elección gustativa innata es de vital importancia para la supervivencia de los seres vivos y que se conocen regiones cerebrales que ayudan al procesamiento gustativo y además, aportan información clave para la toma de decisiones, es posible sugerir que la COF, la CI, el NAcc, el tálamo gustativo y el NTS (ver figura 7) participan en la preferencia y rechazo natural de alimentos.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de las elecciones ha permitido conocer los mecanismos y estructuras cerebrales que participan al momento de llevar a cabo una decisión que puede ser considerada vital para los seres vivos. Un tipo de elecciones son las motivadas por estímulos que generan de manera natural una aceptación o rechazo en las que, los seres vivos no necesitan de experiencias previas para llevar a cabo una elección, sin embargo en estas elecciones no se conocen modelos para su estudio. Dado que el sistema gustativo ha sido ampliamente estudiado y que de manera fácil y clara se conocen sabores que son apetitivos o aversivos de manera natural para el organismo y que se puede establecer un modelo claro que permita evaluar las elecciones guiadas por estímulos gustativos innatos en esta tesis se tiene por objetivo conocer qué regiones cerebrales son necesarias para conductas de elección guiadas por estímulos gustativos innatos.

OBJETIVOS

- Estandarizar un protocolo conductual que permita el estudio de las regiones cerebrales que participan en la elección guiada por estímulos gustativos innatos.
- Identificar si la COF, la CI, el NAcc, el tálamo gustativo y el NTS son regiones cerebrales necesarias en la elección guiada por estímulos gustativos que generan una preferencia o rechazo innato.

HIPÓTESIS

H_A: Si una región cerebral es necesaria en la elección guiada por estímulos gustativos innatos entonces, su desactivación modificará la tendencia natural de consumir los alimentos con sabores dulces y rechazar los alimentos con sabores amargos.

H₀: Si una región cerebral no es necesaria en la elección guiada por estímulos gustativos innatos entonces, su desactivación no modificará la tendencia natural de consumir los alimentos con sabores dulces y rechazar los alimentos con sabores amargos.

MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Animales

Se utilizaron 143 ratas macho de la cepa Wistar con pesos iniciales de 270 a 310 gramos. Las ratas fueron colocadas de manera individual en cajas de acrílico transparente en el vivarium del Instituto de Fisiología Celular. Dentro del vivarium se contó con temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y con humedad relativa del 40 al 79%, con un ciclo de 12 horas luz/ oscuridad y con libre acceso de comida/ agua, hasta que el protocolo indique lo contrario. Todas las manipulaciones a los animales fueron aprobadas por el comité de bioética del Instituto de Fisiología Celular con el número FSB 33-14.

5.2 Cirugía

Las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina (90 mg/ Kg) y xilazina (10 mg/ Kg). Una vez anestesiados los animales, fueron colocados en el aparato estereotáxico previamente limpio y se les aplicó lidocaína subcutánea como anestésico local. Posteriormente, se aplicó benzal para limpiar el área del cráneo donde se realizó una incisión con el bisturí que mostró el cráneo y se realizaron trépanos donde se introdujeron guías-cánulas de manera bilateral de acuerdo con coordenadas estereotáxicas para cada región de interés (ver tabla 1). Posteriormente, las guías-cánulas se fijaron con cemento dental y se anclaron al cráneo con ayuda de dos tornillos.

Las regiones cerebrales a canular fueron la corteza orbitofrontal, la corteza insular, el núcleo accumbens, el tálamo gustativo y el núcleo del tracto solitario. En la tabla 1 se muestran las coordenadas que se utilizaron para cada región. Las coordenadas dorsoventrales fueron tomadas utilizando a Bregma como punto de referencia.

Regiones cerebrales	Anterior-posterior (mm)	Medial-lateral (mm)	Dorsal-ventral (mm)	Inyector (mm)	Referencia
Corteza orbitofrontal	+3.8	±2.6	-3.9	-1.58	(St Onge & Floresco, 2010)
Corteza insular	+1.2	±5.5	-3.0	-1.75	(Parkes, De la Cruz, Bermudez-Rattoni, Coutureau, & Ferreira, 2014)
Núcleo accumbens	+1.5	±1.5	-6.5	-1.58	(Paxinos & Watson, 2006)
Tálamo gustativo	-3.6	±1.2	-6.5	-1.58	(Samuelsen et al., 2013)
Núcleo del tracto solitario	-13.3	±1	-6.8	-1.58	(Garcia-Medina, Vera, & Miranda, 2015)

Tabla 1. Coordenadas utilizadas para la canulación de los animales.

Después de la cirugía los animales permanecieron en recuperación por siete días. Durante este tiempo, en las heridas causadas por la cirugía se administró yodo y violeta de metilo para evitar infecciones locales. Las cánulas se mantuvieron destapadas mediante el uso de agujas dentales del tamaño de la cánula.

Para disminuir las variables de estrés por la manipulación de los animales y facilitar las microinyecciones, desde el día en que se realizó la cirugía hasta el fin del protocolo conductual cada animal fue manipulado diariamente al menos durante tres minutos.

5.3 Protocolo conductual

Una vez transcurridos los siete días de recuperación, los animales se privaron de agua 24 horas antes de iniciar el protocolo conductual. El protocolo conductual está conformado por la línea base y las pruebas que serán descritas a continuación.

5.3.1 Línea base

Para establecer el consumo habitual de agua de los animales bajo las condiciones experimentales, se obtuvieron medidas de su ingesta de líquido durante tres días. Para ello, los animales tuvieron acceso al agua dos veces al día, una por la mañana y, una segunda ocasión, 6 horas después. Como se ejemplifica en la figura 9, se colocaron al mismo tiempo cuatro bebederos con 3 mL de agua cada uno durante 10 minutos, seguidos por un bebedero extra con 6 mL de agua durante 10 minutos.

5.3.2 Pruebas

Al establecerse la línea base, los animales tuvieron acceso a una solución de sacarina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) con una concentración de 0.1% y una solución de quinina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) con una concentración de 0.02%. La primera solución en la concentración presentada es naturalmente preferida, mientras que la solución de quinina en la concentración de 0.02% es naturalmente aversiva. Al igual que en la línea base, se colocaron primero 4 bebederos sólo que en esta ocasión el agua fue sustituida por dos bebederos con 3 mL de la solución de sacarina y dos bebederos con 3 mL de la solución de quinina. Los cuatro bebederos se colocaron al mismo tiempo de manera alternada durante 10 minutos como se observa en la figura 8. Enseguida, se colocó un bebedero extra con 6 mL de agua durante 10 minutos. Se realizaron 5 pruebas siguiendo el horario establecido durante la línea base.

5.4 Desactivación farmacológica temporal

Un día antes de la desactivación farmacológica temporal los animales fueron estimulados para evitar problemas con las guías cánulas y habituar a los animales al uso del material que se utilizó en la desactivación. La estimulación consistió en

insertar un inyector con la distancia total que descenderían las agujas el día de la desactivación. Para la desactivación farmacológica temporal se utilizó una bomba de infusión en la que se colocaron dos jeringas Hamilton de 10 μ L conectadas a las agujas dentales que se utilizaron como inyectores. Los inyectores se insertaron en las guías-cánulas de cada animal y se infundió un coctel de agonistas gabaérgicos usando muscimol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (250 ng/ μ L) y baclofeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (250 ng/ μ L) en el grupo experimental (St Onge & Floresco, 2010) o solución salina en el grupo vehículo. Esta concentración de fármacos se ha utilizado previamente en experimentos del laboratorio (Ramirez-Lugo, 2014) . La desactivación farmacológica temporal se llevó a cabo 10 minutos antes de la prueba 3. La velocidad de inyección fue de 0.4 μ L/ 1 minuto con un volumen total a inyectar de 0.5 μ L.

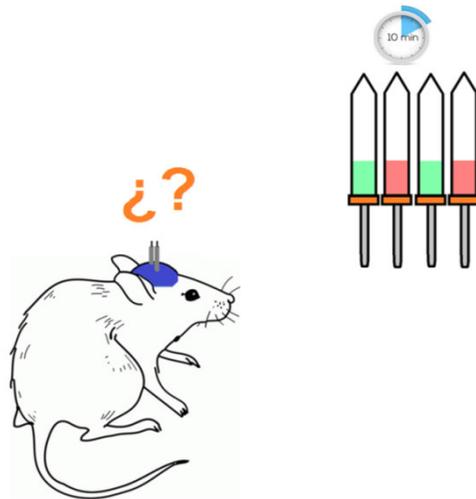


Figura 8. Representación de la prueba conductual después de la desactivación farmacológica. En la parte superior derecha se muestra la manera en que se colocaron los bebederos durante las pruebas. En la prueba correspondiente a la desactivación farmacológica el animal se enfrentó a elegir entre dos estímulos gustativos diferentes (sacarina o quinina).

Para evitar efectos de la inactivación temporal de las estructuras sobre la neofobia gustativa (primera presentación) y la atenuación de la misma (segunda presentación), la desactivación temporal de la región de interés se realizó durante la tercera presentación de las soluciones de sacarina y quinina. La figura 9

muestra resumido el protocolo conductual que se realizó para los experimentos de esta tesis.

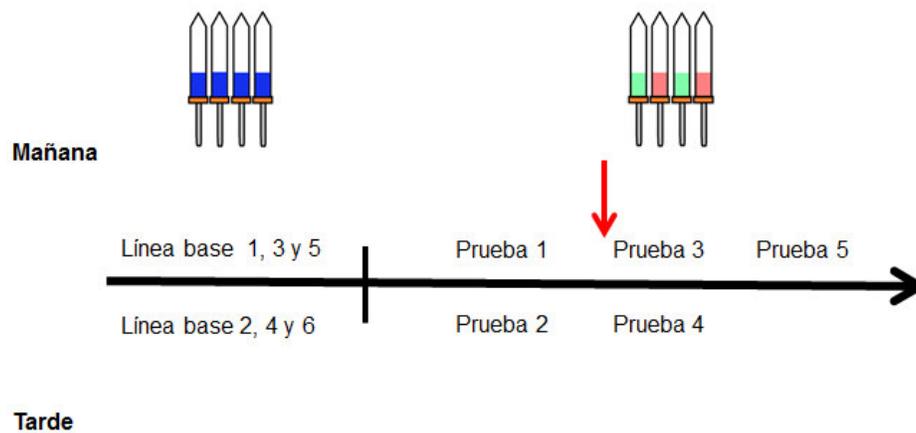


Figura 9. Protocolo conductual. El protocolo comienza cuando las animales fueron privados, es decir se les retira el libre consumo de agua. Posteriormente se obtiene la línea base, donde los consumos fueron únicamente de agua. Después fueron las pruebas en las que, los animales podían elegir entre dos líquidos con sabores diferentes (sacarina y quinina), durante la tercera prueba se realizó la desactivación farmacológica temporal señalada con la flecha roja.

5.5 Perfusión e histología

Una vez concluido el protocolo conductual, se llevó a cabo el análisis de tejido para verificar el sitio de microinyección. Los animales recibieron una sobredosis de hidrato de cloral (Sigma-Chemical, St. Louis, MO) (0.8 mg/kg) que inmovilizó al animal. Una vez que los animales no presentaron ninguna respuesta a la estimulación de la cola y patas, los animales se colocaron en la campana de extracción y se realizó una incisión a lo largo de la caja torácica que permitiera el acceso al corazón. En el corazón se insertó una jeringa conectada a una bomba de perfusión. Los animales se perfundieron con solución salina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una concentración de 0.9%. Concluida la perfusión, se retiró el cerebro de los animales y se almacenó en frascos con una solución de formalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en una concentración del 10% por al menos 5 días para permitir la fijación del tejido. Posteriormente, los cerebros se colocaron en

una solución del 30% de sacarosa en formalina al 10% para su crioprotección. Una vez que el tejido alcanzara la base del recipiente de almacenamiento se llevó a cabo la histología.

Los cerebros se rebanaron a 40 μm en el crióstato. Las rebanadas que se obtuvieron se colocaron en portaobjetos gelatinizados. Los portaobjetos se tiñeron con la tinción de Nissl y se cubrieron con permount y un cubreobjetos. Una vez que los cubreobjetos se secaron, se observaron al microscopio para determinar el sitio de inyección.

Al concluir la histología se descartaron a los animales que presentaron infección en el tejido y a aquellos cuya localización del inyector no fuera en el sitio correcto.

5.6 Análisis de datos

Los resultados fueron registrados y ordenados en hojas de cálculo de Microsoft Office Excel 2007. Las gráficas presentadas se realizaron mediante el programa Graph-Pad Prism versión 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). El análisis estadístico se realizó con el software especializado STATISTICA (StatSoft, versión 10).

Se realizaron pruebas t de Student (muestras no pareadas) para comparaciones de sacarina y quinina entre grupos durante la prueba tres así como para el análisis entre bebederos extra, y análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías de medidas repetidas para las comparaciones sacarina x quinina x tiempo en las pruebas 1,2, 4 y 5 así como para las concentraciones de sacarina y quinina para estandarización del protocolo conductual.

Para obtener el índice de aversión que se muestra en las gráficas y en el análisis estadístico se utilizó para el consumo de quinina la siguiente fórmula

$$\left(\frac{\text{mL sacarina}}{\text{mL sacarina} + \text{mL quinina}} \right) \times 100$$

Fórmula 1. Índice de aversión de quinina. Se obtuvo a partir del consumo de sacarina, dividido entre el consumo total de líquidos, todo esto multiplicado por cien.

Y para el consumo de sacarina la que a continuación se muestra:

$$\left(\frac{\text{mL quinina}}{\text{mL quinina} + \text{mL sacarina}} \right) \times 100$$

Fórmula 2. Índice de aversión de sacarina. Se obtuvo a partir del consumo de quinina, dividido entre el consumo total de líquidos, todo esto multiplicado por cien.

Con los resultados que se obtuvieron de ambas fórmulas (fórmulas 1 y 2) se realizaron las gráficas que se verán más adelante. En ellas, mientras la barra se acerque más al cero significa que los animales ingirieron de manera abundante ese líquido. Es importante recordar que se gráfica el índice de aversión, por lo que mientras más aversivo sea un sabor la barra se acercará más al 100%.

Para obtener el porcentaje de consumo con respecto a la línea base y para el consumo de agua del bebedero extra que se usa en las gráficas y en el análisis estadístico se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mL de agua} \times 100}{\text{promedio de consumo de agua}}$$

Fórmula 3. Porcentaje de consumo con respecto a la línea base. Se obtuvo multiplicando el consumo de agua del bebedero extra o los bebederos con agua por cien, dividido entre el promedio de consumo de agua de todos los animales.

RESULTADOS

Debido a la participación en las elecciones gustativas y a la información que aportan al procesamiento gustativo se estandarizó un protocolo conductual que permitiera evaluar si son necesarias la corteza orbitofrontal, la corteza insular, el núcleo accumbens, el tálamo y el núcleo del tracto solitario en la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos.

6.1 Estandarización del protocolo conductual

Cómo se mencionó anteriormente las conductas que se conocen para las elecciones guiadas por estímulos gustativos innatos son un número reducido, por lo que fue indispensable establecer un protocolo permita evaluar esta clase de elecciones. Para ello, se decidió utilizar al sistema gustativo porque de manera clara permite ver, de manera clara, la preferencia de sabores dulces y el rechazo de sabores amargos.

Con el conocimiento previo de la preferencia y rechazo de sabores se decidió emplear a la sacarina como estímulo gustativo apetitivo y la quinina como estímulo gustativo aversivo. Una vez que se eligieron los estímulos gustativos que se utilizarían en el protocolo fue necesario seleccionar una concentración que permitiera ver de manera clara la diferencia entre la preferencia y el rechazo. La concentración que se utilizó para el protocolo conductual final fue elegida de entre varios experimentos que se realizaron con diferentes concentraciones.

Se probaron tres concentraciones de sacarina 0.75%, 0.5% y 0.1% como se observa en la figura 10. Con la primera concentración 0.75% se observó que los animales modificaban mucho su consumo desde la PBA 1 hasta la PBA 3 esto se demostró empleando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas ($F_{(4,16)}=3.1167$, $p=0.04485^*$) se obtuvieron diferencias significativas y debido a estas diferencias

considerables de las primeras pruebas se determinó que no era la concentración adecuada para el protocolo conductual que se deseaba establecer. Debido a lo anterior, se decidió disminuir la concentración de sacarina a 0.5%, al hacerlo se observó que durante las primeras pruebas la diferencia en el consumo con respecto al día anterior aumentaba, empleando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas ($F_{(4,8)}=11.326$, $p=0.00223^*$), se obtuvieron diferencias significativas porque la ingesta de líquidos variaba a lo largo de las pruebas convirtiendo así, esta concentración en inadecuada. Al observar que la conducta de los animales con las concentraciones anteriormente descritas no funcionaba se redujo de manera considerable la concentración de sacarina para el siguiente experimento de estandarización. En el último experimento, la concentración que se utilizó fue 0.1%, y empleando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas ($F_{(4,16)}= 0.82958$, $p=0.52567$) no se encontraron diferencias significativas en el consumo de líquido a lo largo de las pruebas, el consumo durante las cinco pruebas permanecía constante y además, la desviación estándar era menor con respecto a las concentraciones utilizadas anteriormente.

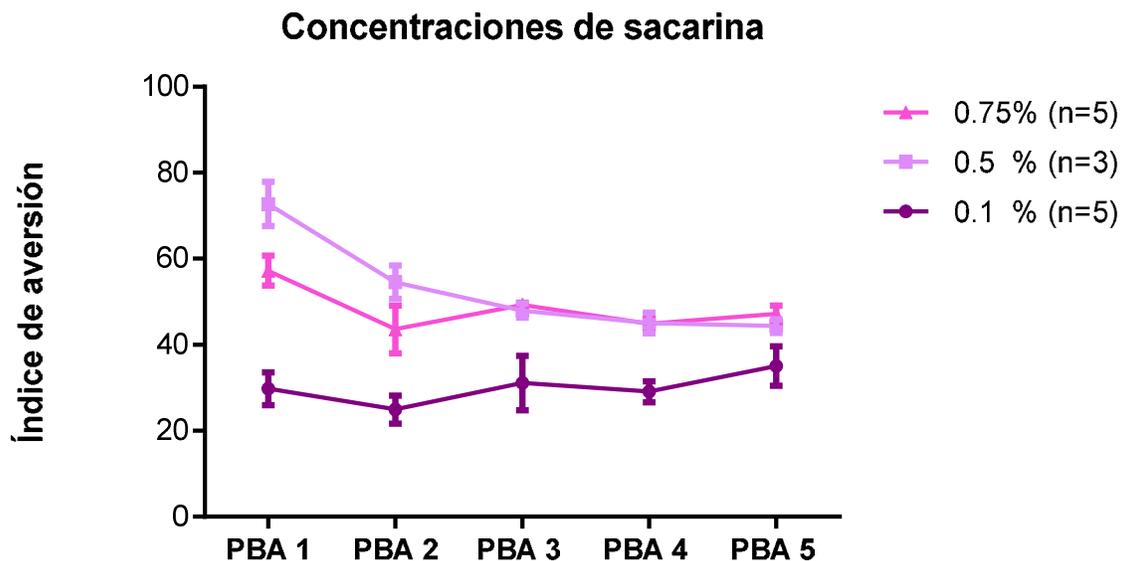


Figura 10. Concentraciones de sacarina, se observan las diferentes concentraciones que fueron probadas para establecer el protocolo conductual.

De esta manera se determinó que para el protocolo conductual que se deseaba establecer la concentración adecuada de sacarina es al 0.1%. Esto se debe a que con esta concentración la conducta de los animales es constante, ya que la cantidad de líquido que ingieren es casi el mismo durante las cinco pruebas y se observa claramente la preferencia a los sabores dulces.

Al mismo tiempo que se determinó la concentración de sacarina a utilizar en el protocolo conductual de esta tesis, también se estableció la concentración de quinina. Para la estandarización se utilizaron tres concentraciones de quinina 0.005%, 0.015% y 0.02% como se observa en la figura 11. La primera concentración en ser probada fue 0.005%, empleando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas ($F_{(4,16)}=1.4224$, $p=0.27170$) no se encontraron diferencias significativas en el consumo a lo largo de las pruebas, sin embargo se observó que los animales la ingerían de manera similar a algunas concentraciones de sacarina (0.5% y 0.75%) al observar esto, fue evidente que los animales no mostraban un marcado rechazo a esta concentración, por lo que se determinó que no era la concentración adecuada. La siguiente concentración en ser puesta a prueba fue 0.015%, empleando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas ($F_{(4,16)}=1.0248$, $p=0.42439$) no se obtuvieron diferencias significativas en el consumo a lo largo de las pruebas. También se observó que el consumo de quinina era bajo pero continuaba cercano al 50% y algunos de los animales ingerían el líquido de manera similar a la sacarina, por lo que no se observaba una conducta unánime en los animales, lo que complicaba observar alguna modificación en la ingesta porque algunos animales ni siquiera intentaban consumir el líquido y otros lo bebían sin problema alguno. Ante los resultados obtenidos de las estandarizaciones anteriormente descritas, se decidió aumentar la concentración de quinina a 0.02%, empleando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas ($F_{(4,16)}=0.44638$, $p=0.77349$) no se encontraron diferencias significativas en la ingesta de líquido a lo largo de las pruebas. A diferencia de las concentraciones anteriormente utilizadas con 0.002% se observó de manera clara el rechazo del líquido en todos los animales.

Por lo anterior, se estableció que la concentración de quinina adecuada para el protocolo conductual es 0.02%, porque con esta concentración se observa de manera clara el rechazo de los animales a los estímulos aversivos, además de que se observa un consumo constante durante las cinco pruebas y en todos los animales.

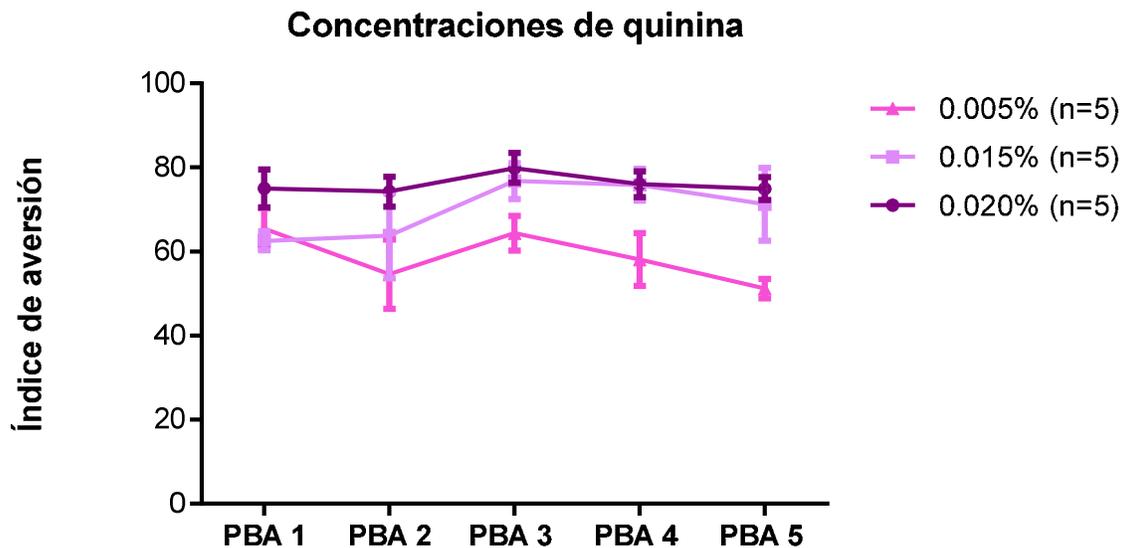


Figura 11. Concentraciones de quinina, se observan las diferentes concentraciones que fueron probadas para establecer el protocolo conductual.

En la figura 12 se observa el índice de aversión de sacarina 0.1% y de quinina 0.02%. Se observa que el índice de aversión de sacarina ronda al 20% sugiriendo que los animales prefieren consumir este estímulo en comparación con la quinina ya que, se muestra que el índice de aversión está cercano al 80% es decir, que los animales evitan el consumo de este estímulo gustativo.

Una vez seleccionadas las concentraciones a utilizar en el protocolo conductual de esta tesis, fue necesario elegir la prueba en la que se realizaría la desactivación farmacológica temporal. Para ello, era necesario encontrar con pruebas previas que permitieran observar la cantidad de sacarina y quinina que ingerían los animales y también contar con pruebas posteriores que permitieran observar

cuando el efecto de la desactivación farmacológica terminara. Con los requisitos solicitados se eligió a la prueba tres porque permitía observar la conducta de ingesta previa y posterior a ella.

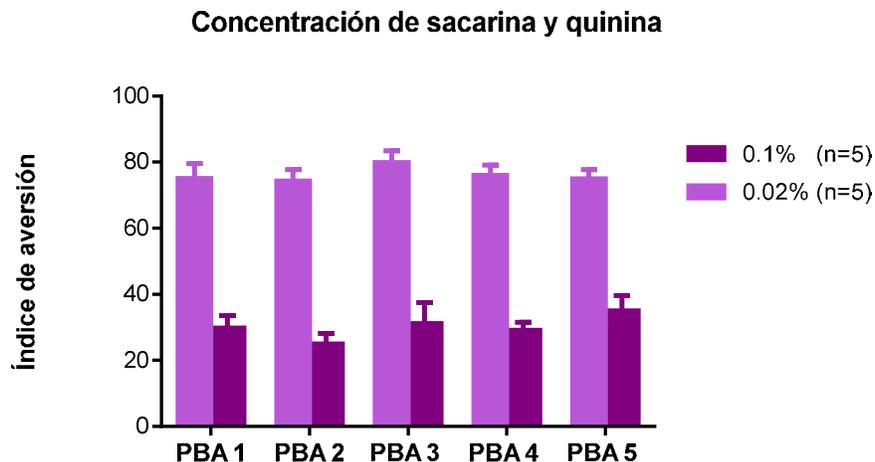


Figura 12. Concentración de sacarina y quinina. Se muestra el consumo de sacarina y quinina a lo largo de las pruebas.

En resumen, para establecer el protocolo conductual se probaron diferentes concentraciones de sacarina y quinina. La intención de probar las diferentes concentraciones era la búsqueda de un rechazo y una preferencia clara entre los estímulos gustativos. Esto se consiguió al utilizar sacarina al 0.1% y quinina al 0.02%, convirtiéndose de esta manera, en las concentraciones adecuadas para el protocolo conductual que se utilizó en esta tesis. También se eligió la prueba 3 para llevar a cabo la desactivación farmacológica temporal porque nos permite comparar la conducta de ingesta antes y después de los animales.

Una vez estandarizado el protocolo conductual se comenzó con las desactivaciones farmacológicas de las estructuras cerebrales candidatas para esta tesis. A continuación se muestran los resultados obtenidos de las estructuras que fueron desactivadas. En primera instancia se muestran los promedios de consumo de las líneas base para ambos grupos del experimento, seguidas de la información correspondiente a las pruebas. El análisis se llevó a cabo comenzando por las

pruebas 1 y 2, después la desactivación farmacológica (prueba 3) y el consumo de agua que le corresponde y por último, con las pruebas 4 y 5.

6.2 La desactivación farmacológica temporal de la COF no afecta la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos

Los grupos experimentales de esta región cerebral contaron con una n de 9 animales en el grupo vehículo y una n de 10 animales en el grupo experimental (M&B). En la figura 13A se muestra el sitio de microinyección de cada uno de los animales.

Durante las líneas base los animales son acostumbrados a beber agua en los periodos de tiempo necesarios para el protocolo conductual. Con el porcentaje de consumo de agua respecto a la línea base de la mañana ($t_{30} = -0.452008$, $p = 0.654514$) y de la tarde ($t_{30} = -0.244855$, $p = 0.808236$) y utilizando una t de Student no pareada se verificó que los grupos del experimento no tuvieron diferencias en la ingesta de líquido antes de ser sometidos a las pruebas.

Una vez que los animales concluyeron las líneas base fueron sometidos a las pruebas. En la figura 13B se muestra el índice de aversión de los animales durante esta parte del protocolo conductual. En las pruebas 1 y 2 se observa que el índice de aversión de sacarina y de quinina es prácticamente el mismo en ambos grupos del experimento. Lo anterior se corroboró utilizando un ANOVA de medidas repetidas y no se observan diferencias significativas entre el grupo vehículo y el grupo M&B ($F_{(1,34)} = 0.0000$, $p = 1.0000$), esto sugiere que el efecto que provocó la desactivación farmacológica temporal no proviene de los consumos de las pruebas anteriores. Adicionalmente, se observa que el índice de aversión de sacarina se encuentra por debajo del 50% mientras que el de quinina alcanza casi el 80%. Empleando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas se muestra que hay diferencias significativas entre los sabores ($F_{(1,34)} = 744.31$, $p =$

0.0000*) durante las pruebas 1 y 2. Lo que sugiere que el consumo de los animales es de acuerdo a lo esperado previo a la desactivación farmacológica, prefiriendo la sacarina y rechazando la quinina.

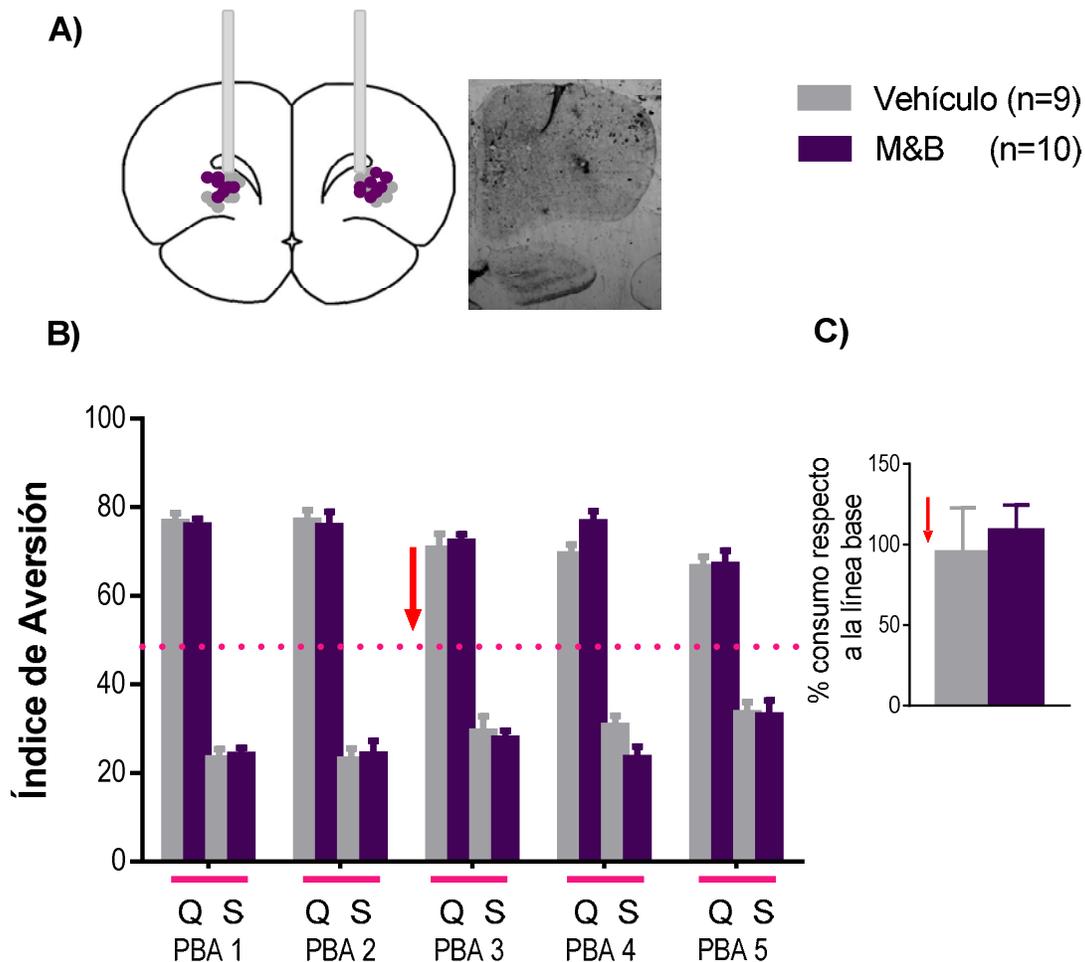


Figura 13. Desactivación farmacológica de la corteza orbitofrontal. **A**, reconstrucción de los sitios de microinyección; los puntos grises representan a los animales del grupo vehículo y los puntos violetas a los animales del grupo M&B. **B**, índice de aversión; se muestra el índice de aversión de sacarina (S) y de quinina (Q) durante todas las pruebas. La flecha roja representa el momento de la desactivación farmacológica. **C**, bebedero extra; se muestra el porcentaje de consumo con respecto a la línea base durante la prueba 3.

Al día siguiente, diez minutos antes de la prueba tres, se llevó a cabo la desactivación farmacológica temporal. En esta prueba se observa que tanto en el grupo vehículo como en el grupo M&B no hay cambios en el índice de aversión ni en el consumo de sacarina ni en el consumo de quinina. Un análisis estadístico,

usando la prueba t de Student no pareada, muestra que no hay diferencias significativas en el consumo de sacarina ($t_{17}= 0.429174$, $p= 0.673186$) ni en el de quinina ($t_{17}= -0.429174$, $p=0.673186$) entre los grupos experimentales. Lo anterior sugiere que la corteza orbitofrontal no es necesaria en la elección guiada por estímulos gustativos innatos.

En la figura 13C se muestra el porcentaje de consumo de agua respecto a la línea base del bebedero extra de ambos grupos durante la prueba tres. Se observa que ambos grupos tuvieron un consumo de agua cercano al 100%. Un análisis estadístico usando la prueba t de Student no pareada manifiesta que no hay diferencias significativas en ambos grupos ($t_{17}= 1.365515$, $p= 0.189888$). Este resultado sugiere que la desactivación farmacológica no tuvo efectos motores en los animales, y que los animales están motivados a beber líquido por lo tanto, la tarea a la que estuvieron expuestos los animales no se afectó por algún efecto secundario de la desactivación farmacológica.

En las pruebas 4 y 5 se observa que no hay cambios relevantes en el consumo de quinina ni de sacarina. Utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas se muestra que no hay diferencias significativas entre grupos ($F_{(1,34)}= 0.0000$, $p= 1.0000$). Lo anterior, sugiere que no hay efectos a largo plazo por la desactivación farmacológica temporal.

6.3 La desactivación farmacológica temporal de la CI no afecta la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos

Los grupos experimentales de esta región contaron con una n de 5 animales en el grupo vehículo y una n de 6 animales en el grupo M&B. En la figura 14A se representa el sitio de localización del inyector.

Antes de someter a los animales a las pruebas, los animales se acostumbran a beber agua. Usando como análisis estadístico la prueba t de Student no pareada se muestra que en el consumo de agua durante la línea base no hay diferencias significativas, tanto para los consumos de la mañana ($t_{20} = 1.510404$, $p = 0.146579$) como para los consumos de la tarde ($t_{20} = 0.664045$, $p = 0.514245$). Lo anterior sugiere que los grupos experimentales partieron de consumos similares para asegurar que cualquier modificación durante la desactivación farmacológica se deba a diferencias previas.

En la figura 14B se presenta el índice de aversión de los animales durante las cinco pruebas. En las pruebas 1 y 2, ambas realizadas en el día 1, se observa que el índice de aversión de sacarina y de quinina es similar ambos grupos del experimento. Utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas se muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos ($F_{(1,18)} = 0.10715$, $p = 0.74718$) pero sí entre los sabores ($F_{(1,18)} = 909.47$, $p = 0.00000^*$). Lo anterior se puede observar porque el índice de aversión de sacarina se encuentra cercano al 20% y el índice de aversión de quinina alcanza casi el 80%. Estos resultados, al igual que en corteza orbitofrontal, demuestran que los animales tienen una clara preferencia por la sacarina y un evidente rechazo por la quinina, consumiendo más la primera y evitando la ingesta de la segunda.

En el día 2, diez minutos antes de la prueba tres, se llevó a cabo la desactivación farmacológica. Mediante el uso de la prueba t de Student no pareada se observa que no hay diferencias significativas en el consumo de sacarina ($t_9 = -0.754701$, $p = 0.469715061$) ni en el de quinina ($t_9 = 0.616427$, $p = 0.552883$) entre el grupo vehículo y el grupo experimental. En la figura 14C se observa el consumo de agua que ambos grupos experimentales tuvieron después de la prueba 3. Usando la prueba t de Student no pareada se muestra que no hay diferencias significativas en el porcentaje de consumo agua de ambos grupos ($t_{17} = 1.365515$, $p = 0.189888$). Este resultado sugiere que la desactivación farmacológica no tiene efectos secundarios durante la ingesta de agua del bebedero extra. Estos resultados

sugieren que la corteza insular no es necesaria en la elección guiada por estímulos gustativos innatos.

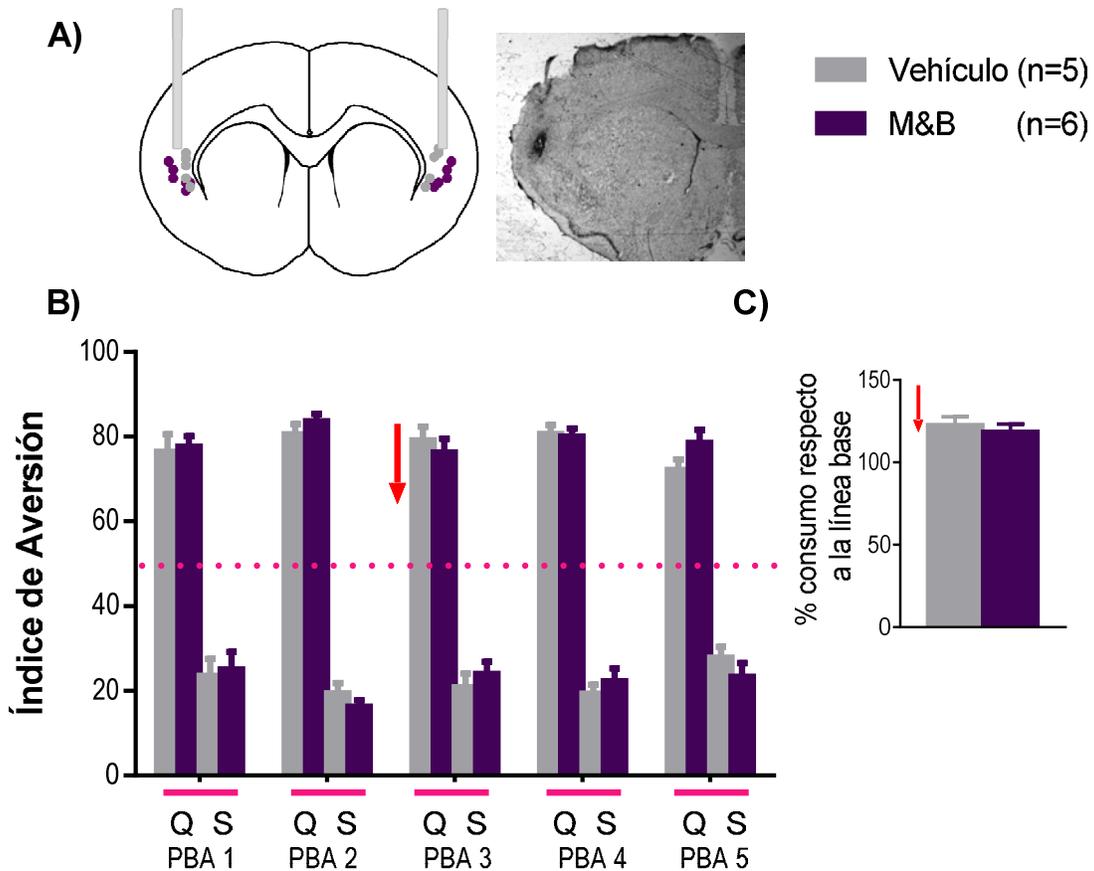


Figura 14. Desactivación farmacológica de la corteza insular. **A**, reconstrucción de los sitios de microinyección; en gris se representan a los animales del grupo vehículo y en violeta a los animales del grupo M&B. **B**, índice de aversión; se muestra el índice de aversión de sacarina (S) y de quinina (Q) durante todas las pruebas. La flecha roja muestra el momento de la desactivación farmacológica. **C**, bebedero extra; se muestra el porcentaje de consumo con respecto a la línea base durante la prueba 3.

Para las pruebas posteriores a la desactivación farmacológica (pruebas 4 y 5) se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, este análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos del experimento ($F_{(1,18)} = 0.18881$, $p = 0.66907$), es decir, tanto los animales del grupo vehículo como el grupo M&B continuaron bebiendo la misma cantidad de sacarina y quinina. Esto

sugiere que en las pruebas posteriores a la desactivación farmacológica no se encontraron diferencias en el consumo de las soluciones presentadas.

Los resultados muestran que la desactivación farmacológica temporal de la corteza gustativa primaria (CI) no modifica la ingesta de sacarina ni de quinina. Esto sugiere que estas cortezas no participan en nuestra conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos.

6.4 La desactivación farmacológica temporal de la NAcc no afecta la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos

Los grupos experimentales finales contaron con una n de 7 animales en el grupo vehículo y una n de 5 animales en el grupo M&B. En la figura 15A se representa el sitio de infusión y localización del inyector.

Antes de someter a los animales a las pruebas, los animales se acostumbran a beber agua. La prueba t de Student no pareada muestra que en el consumo de agua con respecto a la línea base del primer ($t_{22} = -1.25785$, $p = 0.221632$) y segundo consumo ($t_{22} = -0.752112$, $p = 0.459955$) no hay resultados significativas descartando así, diferencias en la ingesta de líquido previas a las pruebas.

Durante el día 1, en las pruebas 1 y 2, el índice de aversión de sacarina es alto mientras que el de quinina es bajo, como se puede observar en la figura 15B. Utilizando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas se observa que no hay diferencias significativas entre los grupos ($F_{(1,20)} = 0.12249$, $p = 0.73001$), pero si hay diferencias significativas entre los sabores ($F_{(1,20)} = 185.52$, $p = 0.00000^*$). Estos resultados, al igual que en las estructuras anteriores, muestran que los animales tienen una preferencia por la sacarina y un rechazo por la quinina, consumiendo más la sacarina y evitando la ingesta de quinina.

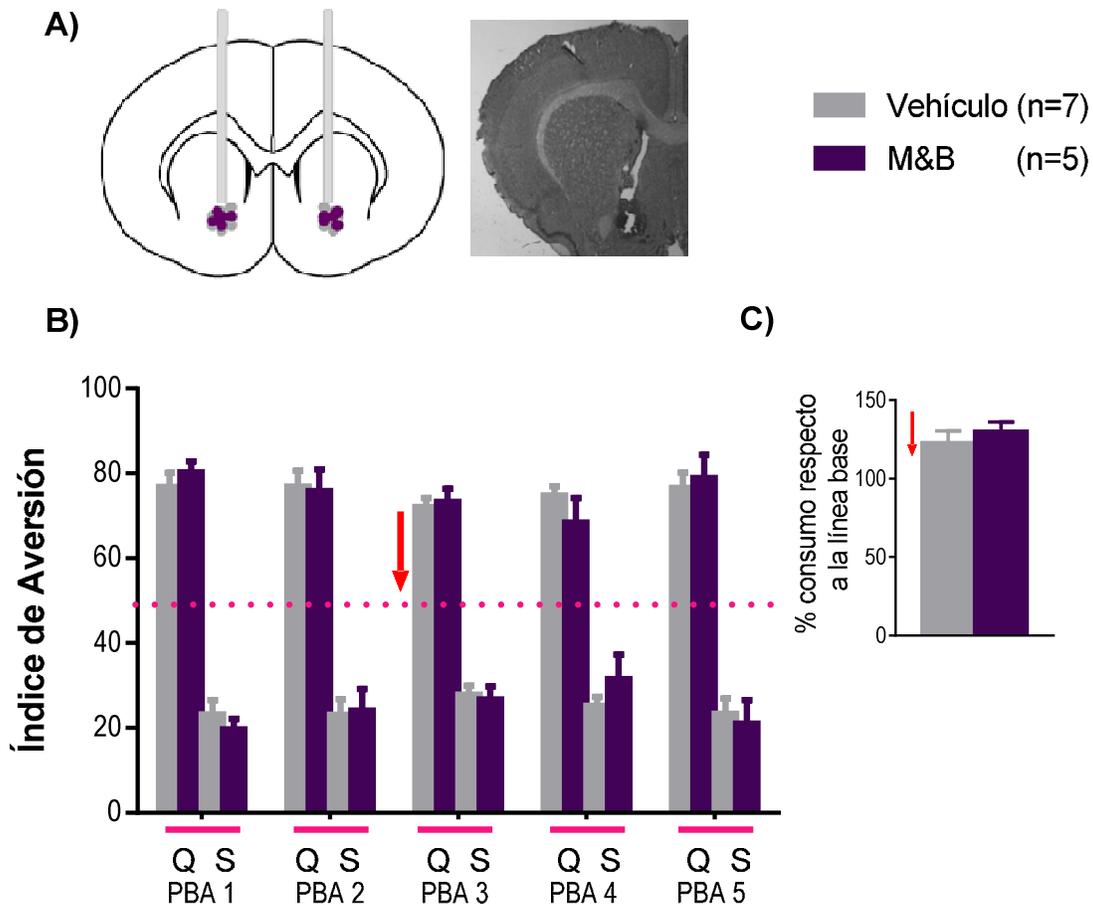


Figura 15. Desactivación farmacológica del núcleo accumbens. **A**, reconstrucción de los sitios de microinyección; en gris se representan a los animales del grupo vehículo y en violeta a los animales del grupo M&B. **B**, índice de aversión; se muestra el índice de aversión de sacarina (S) y de quinina (Q) durante todas las pruebas. La flecha roja muestra el momento de la desactivación farmacológica. **C**, bebedero extra; se muestra el porcentaje de consumo con respecto a la línea base durante la prueba 3.

La desactivación farmacológica se llevó a cabo en el día dos, diez minutos antes de la prueba tres. Mediante el uso de la prueba t de Student no pareada se muestra que no hay diferencias significativas en el consumo de sacarina ($t_{10} = -0.662943$, $p = 0.52235$) ni en el de quinina ($t_{10} = 0.142760$, $p = 0.889315$) entre el grupo vehículo y el grupo experimental como se observa en la gráfica 15B. Como se observa en la figura 13C y mediante el uso de la prueba t de Student no pareada en el porcentaje de consumo de agua del bebedero extra no existen diferencias significativas ($t_{10} = -1.82529$, $p = 0.097927$). Lo mismo ocurre para las

pruebas 4 y 5, un ANOVA de dos vías de medidas repetidas muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos ($F_{(1,20)} = 0.06715$, $p = 0.79818$). Lo anterior sugiere que el núcleo accumbens no es necesario en la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos ni existe un efecto en las pruebas posteriores a la desactivación farmacológica.

6.5 La desactivación farmacológica temporal del tálamo gustativo no afecta la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos

En esta región cerebral el grupo vehículo contó con una n de 7 animales y el grupo M&B con una n de 8 animales. En la figura 16A se observa el sitio de inyección.

El consumo de agua durante la línea base de ambos grupos experimentales no muestra diferencias significativas, tanto para el consumo de la mañana ($t_{28} = 0.749810$, $p = 0.459624$) como para el consumo de la tarde ($t_{28} = -0.399083$, $p = 0.692860$) lo anterior fue revelado usando como análisis estadístico la prueba t de Student.

En la figura 16B se observa el índice de aversión de los animales durante las cinco pruebas. En las primeras dos pruebas se corroboró que no hubiera diferencias significativas para eliminar efectos previos a la desactivación farmacológica. Estas diferencias fueron descartadas mediante la aplicación de un ANOVA de dos vías de medidas repetidas en la que se observa que no hay diferencias significativas entre los grupos ($F_{(1,26)} = 0.0000$, $p = 1.0000$) pero si entre los sabores ($F_{(1,26)} = 479.95$, $p = 0.0000^*$). Estos resultados, muestran que los animales prefieren ingerir el sabor dulce y rechazar el sabor amargo y que no hay diferencias previas a la desactivación farmacológica.

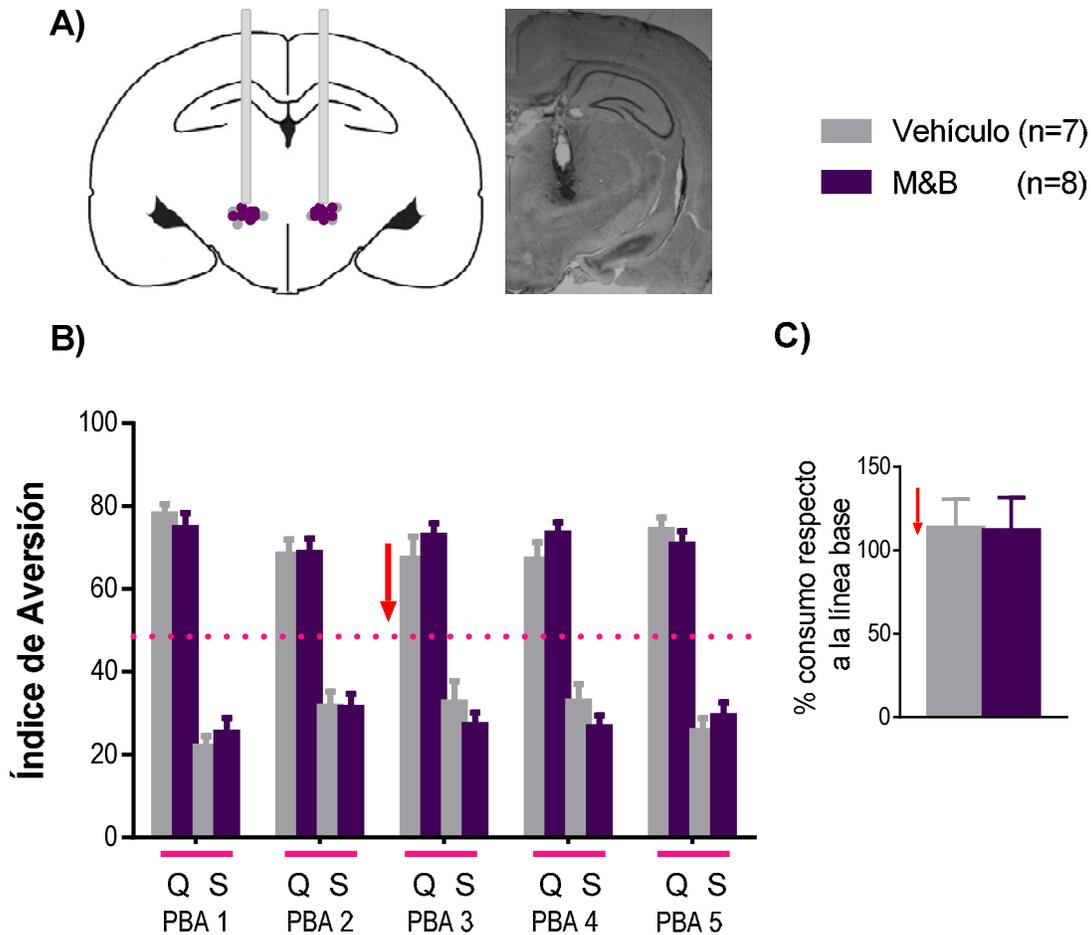


Figura 16. Desactivación farmacológica del tálamo gustativo. **A**, reconstrucción de los sitios de microinyección; en gris se representan a los animales del grupo vehículo y en violeta a los animales del grupo M&B. **B**, índice de aversión; se muestra el índice de aversión de sacarina (S) y de quinina (Q) durante todas las pruebas. La flecha roja muestra el momento de la desactivación farmacológica. **C**, bebedero extra; se muestra el porcentaje de consumo con respecto a la línea base durante la prueba 3.

Usando la prueba t de Student no pareada se muestra que no hay diferencias significativas en el consumo de sacarina ($t_{13}= 0.941947$, $p= 0.363396$) ni en el de quinina ($t_{13}= -0.941947$, $p=0.363396$) entre el grupo vehículo y el grupo experimental durante la desactivación farmacológica de la prueba 3. Usando la prueba t de Student no pareada se muestra que no hay diferencias en el consumo de agua del bebedero extra durante la prueba 3 como se observa en la figura 16C ($t_{13}= 0.165946$, $p= 0.870752$). Estos resultados sugieren que la desactivación

farmacológica del tálamo no provoca efectos secundarios que afecten el consumo de líquidos.

Para las pruebas que siguieron a la desactivación farmacológica se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, este análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos ($F_{(1,26)} = 0.0000$, $p = 1.0000$), es decir, los animales del grupo vehículo y los del grupo M&B continuaron bebiendo ambos líquidos en cantidades casi iguales. Lo anterior sugiere que el tálamo no es necesario en la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos y además, que no hay efectos en las pruebas posteriores a la desactivación farmacológica.

Los resultados anteriores sugieren que ni el núcleo accumbens ni el tálamo gustativo, ambas regiones subcorticales, no son estructuras necesarias en la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos.

6.6 La desactivación farmacológica temporal del NTS no afecta la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos

Los grupos experimentales de esta región contaron con una n de 4 animales en el grupo vehículo y una n de 6 animales en el grupo M&B. En la figura 17A se muestra el sitio de inyección.

Al finalizar la línea base la prueba t de Student muestra que en el consumo de agua correspondiente no se encontraron diferencias significativas, tanto para el primer consumo ($t_{14} = 0.223349$, $p = 0.825154$) como en el segundo consumo ($t_{14} = 0.769753$, $p = 0.448957$).

En la figura 17B se observa el índice de aversión de los animales durante las cinco pruebas. En las primeras dos pruebas se corroboró que no hubiera diferencias

significativas para eliminar efectos previos a la desactivación farmacológica. Estas diferencias fueron descartadas mediante la aplicación de un ANOVA de dos vías de medidas repetidas en la que se observa que no hay diferencias significativas entre los grupos ($F_{(1,14)} = 0.06999$, $p = 0.79521$) pero si entre los sabores ($F_{(1,14)} = 75.028$, $p = 0.00000$). Estos resultados, muestran que los animales prefieren ingerir el sabor dulce y rechazar el sabor amargo y que no hay diferencias previas a la desactivación farmacológica.

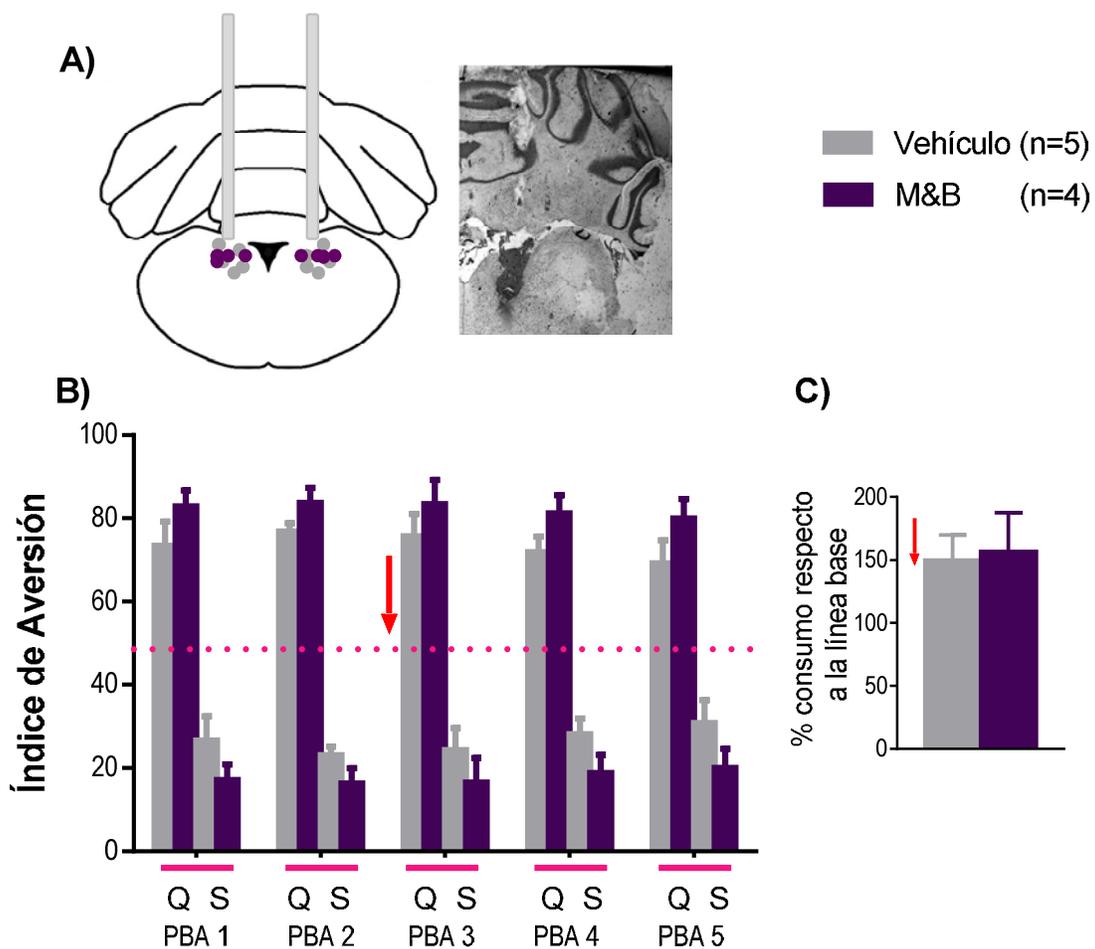


Figura 17. Desactivación farmacológica del núcleo del tallo cerebral gustativo. **A**, reconstrucción de los sitios de microinyección; en gris se representan a los animales del grupo vehículo y en violeta a los animales del grupo M&B. **B**, índice de aversión; se muestra el índice de aversión de sacarina (S) y de quinina (Q) durante todas las pruebas. La flecha roja muestra el momento de la desactivación farmacológica. **C**, bebedero extra; se muestra el porcentaje de consumo con respecto a la línea base durante la prueba 3.

Usando la prueba t de Student no pareada se muestra que no hay diferencias significativas en el consumo de sacarina ($t_7 = 0.080992$, $p = 0.937716$) ni en el de quinina ($t_7 = 0.742136$, $p = 0.482159$) entre el grupo vehículo y el grupo experimental durante la desactivación farmacológica de la prueba 3. Usando la prueba t de Student no pareada se muestra que no hay diferencias en el consumo de agua del bebedero extra durante la prueba 3 ($t_8 = -2.00309$, $p = 0.080132$) como se observa en la figura 15C. Estos resultados sugieren que la desactivación farmacológica del tálamo no provoca efectos secundarios que afecten el consumo de líquidos.

Para las pruebas que siguieron a la desactivación farmacológica se realizó un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, este análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos ($F_{(1,14)} = 0.00129$, $p = 0.97180$), es decir, los animales del grupo vehículo y los del grupo M&B continuaron bebiendo ambos líquidos en cantidades casi iguales. Lo anterior sugiere que el tálamo no es necesario en la conducta de elección guiada por estímulos gustativos innatos y además, que no hay efectos en las pruebas posteriores a la desactivación farmacológica.

DISCUSIÓN

Debido a la importancia que tiene la elección de alimentos, se han estudiado diferentes regiones cerebrales que participan en el procesamiento cerebral de la información gustativa, y que además contribuyen a las elecciones. Las regiones cerebrales que fueron estudiadas son la COF, la CI, el NAcc, el Tálamo gustativo y el NTS. El protocolo conductual consistió en poner a los animales ante dos posibles opciones de consumo líquido, una dulce (sacarina) y una amarga (quinina), y desactivar farmacológicamente alguna región de las que se mencionaron anteriormente. Con la desactivación farmacológica de las estructuras se esperaba que aumentara o disminuyera el consumo de cualquiera de los dos líquidos disponibles, sin embargo en ninguna de las regiones cerebrales se observó cambio alguno en la ingesta de sacarina y quinina, con respecto a los grupos control. El hecho de no encontrar los resultados que se esperaban sugiere que estas regiones cerebrales no son necesarias en las elecciones de carácter gustativo innato, lo que es sorprendente ya que estas regiones cerebrales participan en varios procesos que aportan información que se considera útil para esta clase de elecciones.

7.1 Áreas corticales: orbitofrontal e insular

De acuerdo con la literatura, las elecciones gustativas pueden ser de dos tipos: guiadas por estímulos innatos o aquellas en las que las que hay de por medio un aprendizaje. Algunos estudios han mostrado que la corteza orbitofrontal es una estructura clave en la toma de decisiones aprendida (Zald, 2009), en las que las experiencias previas modifican la conducta de elección de una animal en presentaciones futuras. Debido a esta participación, se eligió la COF como una región candidata en las elecciones guiadas por estímulos gustativos innatos, sin

embargo como sugieren los resultados obtenidos en el trabajo experimental de esta tesis, la COF no es necesaria en este tipo de elecciones gustativas. Lo anterior es posible, probablemente, porque la toma de decisiones o elecciones aprendidas son procesadas a través de diferentes regiones cerebrales, mientras que, las elecciones de carácter innato se llevan a cabo en un conjunto de regiones cerebrales distintas, que posiblemente no incluye a la COF.

Las elecciones han sido ampliamente estudiadas y una de las regiones que ha sido descrita es la COF y ha sido implicada en las elecciones aprendidas. En el laboratorio se ha observado que la desactivación farmacológica temporal de esta corteza afecta la capacidad de las ratas para elegir entre consumir agua y sacarina. La sacarina fue asociada previamente con malestar gástrico por lo que se observaba que los animales rechazaban su ingesta en condiciones normales es decir cuando se inyecta el vehículo o durante una presentación sin fármaco. Al momento de la desactivación farmacológica se observó que los animales no podían elegir qué estímulo consumir aumentando así, el consumo de sacarina e igualando los consumos de ambos estímulos (Ramirez-Lugo, 2014). Con lo anterior se observó que la COF participa en las elecciones gustativas aprendidas, convirtiéndose en una región clave para las elecciones gustativas guiadas por estímulos que generan respuestas innatas. En los experimentos realizados para esta tesis, se esperaba no encontrar una modificación en el consumo de sacarina pero sí en el de quinina, ya que en el caso de las elecciones aprendidas había aumentado el consumo del estímulo que a través del aprendizaje fue reconocido como aversivo. Sin embargo, al momento de la desactivación farmacológica se observó que el consumo del estímulo aversivo (quinina) y el apetitivo (sacarina) permanecieron sin cambio. Con lo anterior, es posible sugerir que las regiones cerebrales que participan en las elecciones aprendidas e innatas son diferentes y además, que la COF no es una estructura cerebral necesaria en la elección guiada por estímulos gustativos innatos.

Una vez que se observó que la COF no es necesaria en las elecciones gustativas innatas fue importante probar la participación de la CI. En la CI se esperaba no encontrar efecto en las elecciones gustativas de carácter innato, porque esta corteza participa en aquellas conductas que requieren la participación de la memoria gustativa, pero sí encontrar un efecto relacionado con el procesamiento de los estímulos gustativos porque esta corteza aporta información en el procesamiento de la información gustativa. Al momento de la desactivación farmacológica se observó que no hay un efecto en la ingesta de los estímulos gustativos que fueron utilizados, por lo que se puede sugerir que la CI no participa en las elecciones de carácter innato porque posiblemente participa en aquellas elecciones y conductas en las que es necesario las experiencias previas y una clara participación de la memoria gustativa. Pese a su participación en el procesamiento gustativo y en la memoria gustativa (Lin, Arthurs, & Reilly, 2015) en el experimento que se realizó para esta tesis se observó que la corteza insular no es necesaria en las elecciones gustativas innatas. Dado que las elecciones motivadas por la preferencia y rechazo natural de los estímulos no es necesaria la memoria y en conjunto con los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la CI no es una región necesaria en las elecciones guiadas por estímulos gustativos innatos.

7.2 Áreas subcorticales: núcleo accumbens y tálamo

Al obtener los resultados negativos de la participación de las cortezas gustativas era posible sugerir que las elecciones gustativas innatas no necesitan llegar a las cortezas cerebrales para tener una respuesta conductual. Por ello, se decidió llevar a cabo la desactivación de regiones subcorticales como son el NAcc y el tálamo.

El núcleo accumbens ha sido estudiado por su participación en la formación de la memoria y se ha observado que participa en la formación memorias aversivas y

apetitivas (Ramirez-Lugo, Nunez-Jaramillo, & Bermudez-Rattoni, 2007). En el experimento que se realizó para esta tesis, se desactivó farmacológicamente el NAcc y es posible que los resultados obtenidos, donde no se encuentran diferencias estadísticas con respecto al grupo control, se deban a que la sacarina y la quinina son aceptados y rechazados de manera natural y posiblemente no requieren de regiones cerebrales que son necesarias para la memoria.

Como se mencionó anteriormente, el NAcc es el encargado de dar el valor hedónico a los alimentos, si un alimento tiene un alto valor hedónico el individuo ingerirá en mayor cantidad ese estímulo. Con lo anterior, al llevar a cabo la desactivación farmacológica se esperaba que el consumo de sacarina aumentara en el grupo experimental con respecto al grupo vehículo y contrario a eso observamos que ambos grupos de experimentos ingirieron una cantidad prácticamente igual de sacarina.

Mientras que en el tálamo, artículos previos (Reilly & Pritchard, 1996) sugieren que esta región no participa en la preferencia o rechazo innato de sabores, por ejemplo, se observó que las lesiones electrolíticas que se llevaron a cabo afectaron de manera mínima el consumo de sabores apetitivos y aversivos, excepto en el consumo de sacarosa donde se observó que con la lesión electrolítica los animales ingerían en mayor cantidad este estímulo. En conjunto con los resultados anteriormente descritos, se esperaba que en el experimento correspondiente al tálamo gustativo se encontrara un incremento en el consumo de sacarina por ser considerado un estímulo de la misma naturaleza apetitiva que la sacarosa. Sin embargo, como se puede observar en la figura 16, no se observa un incremento en el consumo de sacarina que corresponde a la prueba 3, ni una modificación en la ingesta de los estímulos que estuvieron a disposición de los animales.

Al finalizar los experimentos de las regiones subcorticales (NAcc y tálamo gustativo) y observar que la desactivación farmacológica de estas regiones cerebrales no modificó la ingesta de sacarina y quinina y que por ende, bajo

nuestras manipulaciones farmacológicas, no son regiones cerebrales necesarias en las elecciones gustativas innatas. Con los resultados negativos obtenidos en las regiones subcorticales se decidió probar la conducta a nivel del tallo cerebral, de manera específica en el NTS, esperando que la conducta de elección de esta tesis se llevara a cabo antes de que el procesamiento de información inicie a nivel cerebral.

7.3 Núcleo del tracto solitario

El núcleo del tracto solitario es una región importante en el paso y procesamiento de la información gustativa (Rosen & Di Lorenzo, 2012). Por ello, en la desactivación farmacológica que se realizó para esta tesis se esperaba que en el consumo de alguno de los dos sabores presentados a los animales se encontraran diferencias entre el grupo experimental y el grupo vehículo. Como sugieren los resultados, el NTS no es una región cerebral necesaria en las elecciones innatas gustativas. La región caudal del NTS es la región en la que se ha visto que las neuronas responden de manera particular a los estímulos gustativos, sin embargo aunque en esta tesis se desactivó esa parte del NTS es posible que otras regiones del mismo permitieran el paso de la información gustativa al cerebro y que por ello no se encontraran resultados significativos en la conducta.

El NTS es la región cerebral que recibe la información gustativa procedente de los NC, y por este núcleo es prácticamente obligatorio el paso de información, por lo que al llevar a cabo la desactivación farmacológica se esperaba observar un cambio en la ingesta de sacarina o quinina, sin embargo los consumos no se modificaron. Lo anterior puede deberse a que en esta clase de elecciones no es necesario que la información gustativa llegue al cerebro. La desactivación farmacológica del NTS aporta información a esta idea. Esto se debe a que el paso de la información gustativa en el NTS es prácticamente de carácter obligatorio (Yamamoto & Ueji, 2011), es decir que para que un alimento sea procesado a

nivel cerebral la información de este alimento debe pasar a través de los nervios craneales a esta región cerebral. Por lo que, es posible sugerir que esta clase de decisiones innatas son de tal importancia que los seres vivos ya no necesitan procesar esta información en el cerebro, mejor dicho que el organismo puede ser capaz de responder a la ingesta de sabores con preferencias o aversiones innatas a través de una respuesta refleja. Una respuesta refleja consiste en un proceso por el que se produce una respuesta compensatoria, fácilmente predecible, reproducible, y generalizable, frente a un estímulo (Haines, 2013). En este caso, la ingesta de sabores dulces y amargos es una respuesta que tiene las características de un arco reflejo. La respuesta compensatoria o igual ante un estímulo es visible en todas las pruebas del protocolo conductual, es decir que en las cinco regiones cerebrales que fueron evaluadas en este protocolo conductual, la ingesta de sacarina y quinina es prácticamente la misma sin importar la región cerebral que se desactivó farmacológicamente o el grupo experimental al que los animales pertenecían, también las respuestas conductuales son fácilmente predecibles ya que desde un inicio se contaba con que los animales ingirieran en mayor cantidad el consumo de sabores dulces (sacarina) y rechazaran o tuvieran un bajo consumo de sabores amargos (quinina). Por lo tanto, sugerimos que el NTS es una región cerebral que no es necesaria en las elecciones gustativas de carácter innato.

7.4 Las elecciones gustativas innatas como un sistema integrado

De acuerdo con lo obtenido en los resultados, ninguna de las regiones cerebrales estudiadas son claves en la conducta de elección planteada en esta tesis. Es posible que los resultados negativos que se obtuvieron se deban a que una sola estructura no se encarga de las elecciones gustativas innatas sino que varias estructuras se encargan de ello ya que la supervivencia del organismo no se debe arriesgar de manera alguna. Por lo que, es posible que el organismo tenga más de

una estructura que se encargue de ello, y que la información que proviene de los alimentos sea procesada a la vez en diferentes estructuras. En diversos estudios se ha demostrado que el procesamiento gustativo no se lleva a cabo de manera ordenada ni en una dirección única, sino que es dinámico y distribuido (Katz et al., 2002), es decir que la información puede ser procesada al mismo tiempo en distintas estructuras y sin un orden específico. Por lo que es posible que en el caso de las elecciones gustativas innatas ocurra algo similar porque, como se mencionó anteriormente, estas elecciones son de tal importancia que el organismo necesita que ocurran de manera rápida dentro de un sistema integrado, aumentando de esta manera la probabilidad de que el individuo sobreviva.

Por lo tanto, si se desactivaran dos regiones cerebrales a la vez es posible que se encontrara una modificación en el consumo de sacarina o quinina, explicando de esta manera que una conducta tan importante y básica para los seres vivos debe ser llevada a cabo por un sistema integrado y no por una región cerebral específica. Es por ello que sugerimos que las elecciones gustativas innatas se llevan a cabo a través de un sistema dinámico y distribuido que el permite garantizar la supervivencia de los seres vivos ante el consumo de distintos alimentos.

7.5 La correlación de actividad eléctrica neuronal y conducta no implica causalidad

Los registros de electrofisiología en los que se basó esta tesis son, sin duda alguna, parte importante que muestra en que regiones cerebrales se encuentran células que se encargan de responder a los diferentes estímulos gustativos, sin embargo, no se consideró que ese porcentaje de células que responden a uno o varios estímulos gustativos no son suficientes para ver un reflejo en la conducta del animal. Es decir, que referirse a que 4 o 40% de las células responden a un estímulo gustativo particular no se contempló que ese porcentaje corresponde a

un número muy reducido de neuronas. El bajo número de neuronas que responden ante la ingesta de los distintos estímulos gustativos no necesariamente son capaces de generar una respuesta en la conducta de los animales, se esperaba que en las regiones cerebrales donde hubiera un mayor porcentaje de neuronas que responden a sabores dulces, la desactivación farmacológica provocara que los animales presentaran una modificación en el consumo de sacarina y, de manera similar, en aquellas regiones cerebrales que tienen un mayor porcentaje de neuronas que responden a sabores amargos, se esperaba que el consumo de quinina se modificara. Como se observó en los resultados en ninguna región cerebral que fueron desactivadas farmacológicamente se observa modificación alguna en la ingesta de los líquidos que se presentaron a los animales, por ello podemos sugerir que estas regiones cerebrales procesan información gustativa al mostrar una correlación de actividad neuronal con el consumo de sabores innatos según lo reportado en la literatura. Sin embargo, esta correlación no implica que estas regiones cerebrales sean necesarias para utilizar esta información en conductas de elección guiadas por los sabores innatos.

Si la información proveniente de la ingesta de los sabores a los que sometimos a los animales se procesó como se ha propuesto por varios trabajos de investigación (Katz et al., 2002), es posible pensar que las concentraciones de sacarina (0.1%) y de quinina (0.02%) que se utilizaron no fueron las correctas. Por ejemplo, no se consideró la posibilidad de que bajo esas concentraciones sólo se observara un fenómeno que al momento de la desactivación farmacológica impidiera observar una modificación en los consumos. En el caso de la sacarina se observa este fenómeno porque desde el inicio de las pruebas, los animales consumían la sacarina disponible casi por completo, sin embargo con el límite de los 3 mL disponibles es posible que no se observara si los animales incrementarían su consumo en la prueba correspondiente a la desactivación farmacológica. Por lo que, si en alguna región cerebral los animales aumentaban el consumo de sacarina en la desactivación farmacológica, en los resultados no

fue posible observarlo porque los animales no podían consumir más de la sacarina que tenían disponible.

Por otro lado, este fenómeno también podría estar presente en el consumo de quinina, los animales consumían la cantidad mínima de quinina que les permitía optar entre consumir o no entre un bebedero y otro, sin embargo en una concentración más baja de quinina tal vez, podría ser posible modificar el consumo cuando una región cerebral fuera desactivada, es decir que una concentración más baja de quinina que permitiera que los animales ingirieran más quinina podría permitir ver si los animales tiene una mayor aversión al momento de la desactivación farmacológica. En este caso sugerimos que no haber obtenido una modificación en la ingesta de sacarina y quinina se debe a un efecto techo (máxima cantidad de solución consumida posible) y un efecto piso (mínima cantidad de solución consumida posible) por las concentraciones en las que se utilizaron ambos líquidos.

CONCLUSIÓN

En esta tesis se evaluaron regiones cerebrales que se hipotetizaban eran necesarias para conductas de elección guiadas por estímulos gustativos innatos. Las regiones que se desactivaron farmacológicamente fueron: la corteza orbitofrontal, la corteza insular, el núcleo accumbens, el tálamo y el núcleo del tracto solitario. En ninguna de las regiones cerebrales anteriormente mencionadas se encontraron resultados significativos para la conducta que se llevó a cabo, por lo que es posible que las elecciones de carácter innato no dependan de información que aportan estas regiones cerebrales al ser evaluadas de manera independiente, pudiendo ser un fenómeno más complejo por el tipo de procesamiento requerido.

REFERENCIAS

- Accolla, R., Bathellier, B., Petersen, C. C., & Carleton, A. (2007). Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. *J Neurosci*, *27*(6), 1396-1404. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5188-06.2007
- Barbas, H. (2007). Flow of information for emotions through temporal and orbitofrontal pathways. *J Anat*, *211*(2), 237-249. doi: 10.1111/j.1469-7580.2007.00777.x
- Broche-Perez, Y., Herrera Jimenez, L. F., & Omar-Martinez, E. (2015). Neural substrates of decision-making. *Neurologia*. doi: 10.1016/j.nrl.2015.03.001
- Bures, J., Bermudez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998). *Conditioned taste aversion: Memory of a special kind. Oxford psychology series No. 31. 1998.* New York, NY: Oxford University Press; US.
- Carleton, A., Accolla, R., & Simon, S. A. (2010). Coding in the mammalian gustatory system. *Trends Neurosci*, *33*(7), 326-334. doi: 10.1016/j.tins.2010.04.002
- Chen, J. Y., & Di Lorenzo, P. M. (2008). Responses to binary taste mixtures in the nucleus of the solitary tract: neural coding with firing rate. *J Neurophysiol*, *99*(5), 2144-2157. doi: 10.1152/jn.01020.2007
- Cho, Y. K., Mao, L., & Li, C. S. (2008). Modulation of solitary taste neurons by electrical stimulation of the ventroposteromedial nucleus of the thalamus in the hamster. *Brain Res*, *1221*, 67-79. doi: 10.1016/j.brainres.2008.05.006
- Di Lorenzo, P. M., & Victor, J. D. (2003). Taste response variability and temporal coding in the nucleus of the solitary tract of the rat. *J Neurophysiol*, *90*(3), 1418-1431. doi: 10.1152/jn.00177.2003
- Domjan, M. (2007). *Principios de aprendizaje y conducta*: Editorial Paraninfo.
- Fenu, S., Bassareo, V., & Di Chiara, G. (2001). A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *J Neurosci*, *21*(17), 6897-6904.
- Fernández-Espejo, E. (2000). ¿ Cómo funciona el nucleus accumbens?

- Garcia-Medina, N. E., Vera, G., & Miranda, M. I. (2015). Chemical stimulation or glutamate injections in the nucleus of solitary tract enhance conditioned taste aversion. *Behav Brain Res*, *278*, 202-209. doi: 10.1016/j.bbr.2014.09.023
- Haines, D. E. (2013). *Principios de Neurociencia: Aplicaciones básicas y clínicas*: Elsevier Health Sciences Spain.
- Illescas Huerta, E. S. (2015). *Tarea conductual para estudiar los mecanismos de la inhibición activa del miedo en busca de recompensas*. (Licenciatura en Psicología Texto), Universidad National Autónoma de México.
- Katz, D. B. (2005). The many flavors of temporal coding in gustatory cortex. *Chem Senses*, *30 Suppl 1*, i80-81. doi: 10.1093/chemse/bjh123
- Katz, D. B., Nicolelis, M. A., & Simon, S. A. (2002). Gustatory processing is dynamic and distributed. *Curr Opin Neurobiol*, *12*(4), 448-454.
- Krawczyk, D. C. (2002). Contributions of the prefrontal cortex to the neural basis of human decision making. *Neurosci Biobehav Rev*, *26*(6), 631-664.
- L. Ramírez-Lugo, S. Á.-D., J. Ortiz-Alegría, F. Sotres-Bayon;. (2014). Orbitofrontal cortex is necessary for choice behavior guided by learned, but not innate, taste preferences. *Society for Neuroscience meeting*.
- Lin, J. Y., Arthurs, J., & Reilly, S. (2015). Gustatory insular cortex, aversive taste memory and taste neophobia. *Neurobiol Learn Mem*, *119*, 77-84. doi: 10.1016/j.nlm.2015.01.005
- Mark, G. P., Weinberg, J. B., Rada, P. V., & Hoebel, B. G. (1995). Extracellular acetylcholine is increased in the nucleus accumbens following the presentation of an aversively conditioned taste stimulus. *Brain Res*, *688*(1-2), 184-188.
- Martinez-Selva, J. M., Sanchez-Navarro, J. P., Bechara, A., & Roman, F. (2006). [Brain mechanisms involved in decision-making]. *Rev Neurol*, *42*(7), 411-418.
- Nunes, E. J., Randall, P. A., Podurgiel, S., Correa, M., & Salamone, J. D. (2013). Nucleus accumbens neurotransmission and effort-related choice behavior in food motivation: effects of drugs acting on dopamine, adenosine, and

- muscarinic acetylcholine receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(9), 2015-2025.
- Nunez-Jaramillo, L., Ramirez-Lugo, L., Herrera-Morales, W., & Miranda, M. I. (2010). Taste memory formation: latest advances and challenges. *Behav Brain Res*, 207(2), 232-248. doi: 10.1016/j.bbr.2009.10.040
- Pandurangan, M., & Hwang, I. (2015). Systemic mechanism of taste, flavour and palatability in brain. *Appl Biochem Biotechnol*, 175(6), 3133-3147. doi: 10.1007/s12010-015-1488-3
- Parkes, S. L., De la Cruz, V., Bermudez-Rattoni, F., Coutureau, E., & Ferreira, G. (2014). Differential role of insular cortex muscarinic and NMDA receptors in one-trial appetitive taste learning. *Neurobiol Learn Mem*, 116, 112-116. doi: 10.1016/j.nlm.2014.09.008
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*: Elsevier Science.
- Pritchard, T. C., Edwards, E. M., Smith, C. A., Hilgert, K. G., Gavlick, A. M., Maryniak, T. D., . . . Scott, T. R. (2005). Gustatory neural responses in the medial orbitofrontal cortex of the old world monkey. *J Neurosci*, 25(26), 6047-6056. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0430-05.2005
- Ramirez-Lugo, L. (2014). Orbitofrontal cortex is necessary for choice behavior guided by learned, but not innate, taste preferences *Society for Neuroscience* Washington, DC.
- Ramirez-Lugo, L., Nunez-Jaramillo, L., & Bermudez-Rattoni, F. (2007). Taste memory formation: role of nucleus accumbens. *Chem Senses*, 32(1), 93-97. doi: 10.1093/chemse/bjl023
- Reilly, S. (1998). The role of the gustatory thalamus in taste-guided behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 22(6), 883-901.
- Reilly, S., & Pritchard, T. C. (1996). Gustatory thalamus lesions in the rat: I. Innate taste preferences and aversions. *Behav Neurosci*, 110(4), 737-745.
- Roitman, M. F., Wheeler, R. A., Tiesinga, P. H., Roitman, J. D., & Carelli, R. M. (2010). Hedonic and nucleus accumbens neural responses to a natural

- reward are regulated by aversive conditioning. *Learn Mem*, 17(11), 539-546. doi: 10.1101/lm.1869710
- Rolls, E. T. (1989). Information processing in the taste system of primates. *J Exp Biol*, 146, 141-164.
- Rolls, E. T. (1996). The orbitofrontal cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 351(1346), 1433-1443; discussion 1443-1434. doi: 10.1098/rstb.1996.0128
- Rolls, E. T. (2015). Taste, olfactory, and food reward value processing in the brain. *Prog Neurobiol*, 127-128, 64-90. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.03.002
- Rolls, E. T., & Grabenhorst, F. (2008). The orbitofrontal cortex and beyond: from affect to decision-making. *Prog Neurobiol*, 86(3), 216-244. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.09.001
- Rosen, A. M., & Di Lorenzo, P. M. (2012). Neural coding of taste by simultaneously recorded cells in the nucleus of the solitary tract of the rat. *J Neurophysiol*, 108(12), 3301-3312. doi: 10.1152/jn.00566.2012
- Rudebeck, P. H., Walton, M. E., Smyth, A. N., Bannerman, D. M., & Rushworth, M. F. (2006). Separate neural pathways process different decision costs. *Nat Neurosci*, 9(9), 1161-1168. doi: 10.1038/nn1756
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2002). Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res*, 137(1-2), 3-25.
- Samuelsen, C. L., Gardner, M. P., & Fontanini, A. (2013). Thalamic contribution to cortical processing of taste and expectation. *J Neurosci*, 33(5), 1815-1827. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4026-12.2013
- Saper, C. B. (1982). Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *J Comp Neurol*, 210(2), 163-173. doi: 10.1002/cne.902100207
- Simon, S. A., de Araujo, I. E., Gutierrez, R., & Nicolelis, M. A. (2006). The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat Rev Neurosci*, 7(11), 890-901. doi: 10.1038/nrn2006
- Small, D. M. (2012). Flavor is in the brain. *Physiol Behav*, 107(4), 540-552. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.04.011

- St Onge, J. R., & Floresco, S. B. (2010). Prefrontal cortical contribution to risk-based decision making. *Cereb Cortex*, *20*(8), 1816-1828. doi: 10.1093/cercor/bhp250
- Stapleton, J. R., Lavine, M. L., Wolpert, R. L., Nicolelis, M. A., & Simon, S. A. (2006). Rapid taste responses in the gustatory cortex during licking. *J Neurosci*, *26*(15), 4126-4138. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0092-06.2006
- Van De Werd, H. J., & Uylings, H. B. (2008). The rat orbital and agranular insular prefrontal cortical areas: a cytoarchitectonic and chemoarchitectonic study. *Brain Struct Funct*, *212*(5), 387-401. doi: 10.1007/s00429-007-0164-y
- van den Bosch, I., Dalenberg, J. R., Renken, R., van Langeveld, A. W., Smeets, P. A., Griffioen-Roose, S., . . . Boesveldt, S. (2014). To like or not to like: neural substrates of subjective flavor preferences. *Behav Brain Res*, *269*, 128-137. doi: 10.1016/j.bbr.2014.04.010
- Yamamoto, T., & Ueji, K. (2011). Brain mechanisms of flavor learning. *Front Syst Neurosci*, *5*, 76. doi: 10.3389/fnsys.2011.00076
- Zahm, D. S., & Heimer, L. (1993). Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. *J Comp Neurol*, *327*(2), 220-232. doi: 10.1002/cne.903270205
- Zald, D. H. (2009). Orbitofrontal cortex contributions to food selection and decision making. *Ann Behav Med*, *38 Suppl 1*, S18-24. doi: 10.1007/s12160-009-9117-4