



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de Ciclos Profesionales y de Posgrado
del Colegio de Ciencias y Humanidades

DISFUNCION COGNITIVA E INACTIVACION
COLINERGICA CORTICAL MEDIANTE EL BLOQUEO
ENDOGENO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
NEURONAL

T E S I S

Que para obtener el grado de:
**MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA**

Presenta:
HUMBERTO GUTIERREZ GONZALEZ

Director de Tesis: Dr. Federico Bermúdez Rattoni

México, D.F.

Agosto 1996.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE

| | |
|--|----|
| CAPITULO PRIMERO EL SISTEMA COLINERGICO Y LAS FUNCIONES COGNITIVAS | 1 |
| CAPITULO SEGUNDO FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL Y RECUPERACION DE DEFICIENCIAS COLINERGICAS | 7 |
| CAPITULO TERCERO UN MODELO CORTICAL DE FUNCIONES ASOCIATIVAS | 16 |
| CAPITULO CUARTO OBJETIVO | 19 |
| CAPITULO QUINTO INACTIVACION CORTICAL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL | 21 |
| BLOQUEO DEL NGF Y ACTIVIDAD COLINERGICA | 21 |
| QUIEN RESPONDE AL NGF? | 25 |
| RESULTADOS CONDUCTUALES | 29 |
| CONCLUSION | 35 |
| APENDICE | 42 |
| REFERENCIAS | 46 |

Capítulo Primero

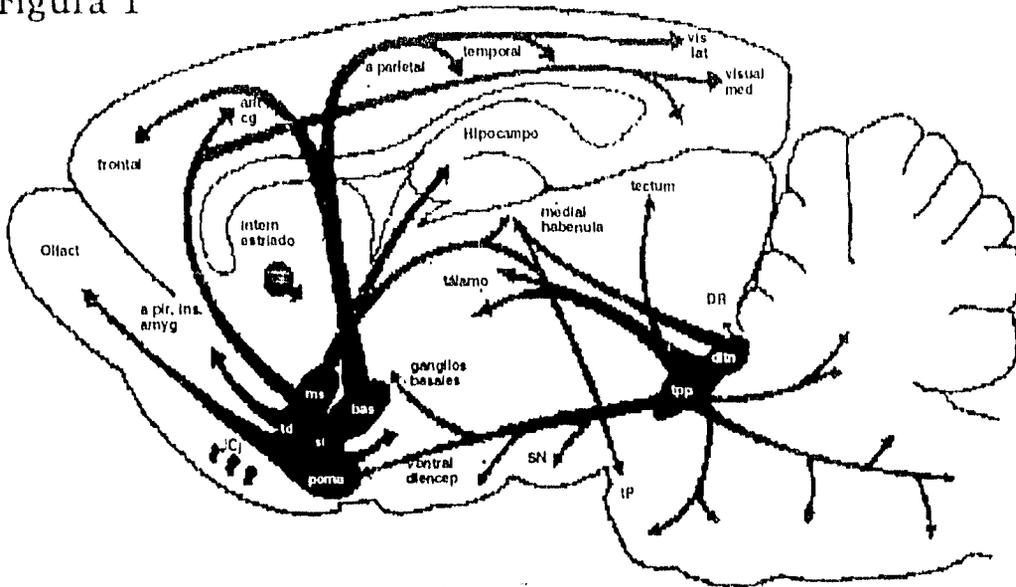
El sistema colinérgico y las funciones cognitivas

Durante las últimas décadas se ha acumulado una gran cantidad de evidencia, procedente tanto de estudios en humanos como mediante la utilización de modelos animales, que sugiere una importante participación de los sistemas colinérgicos centrales en los procesos superiores de aprendizaje y memoria.

Una de las primeras y más extensas líneas de evidencia proviene de estudios de manipulaciones farmacológicas del sistema colinérgico en los cuales se ha mostrado que compuestos anticolinérgicos como escopolamina y atropina, administrados sistémicamente, interfieren con el aprendizaje y memoria de una gran variedad de pruebas conductuales. Por otro lado agonistas colinérgicos como la oxotremorina o bien inhibidores reversibles de la colinesterasa (enzima de degradación de acetilcolina) tales como la fisostigmina, se ha mostrado que facilitan funciones de aprendizaje y revierten deficiencias de memoria experimentalmente inducidas (Nabeshima, 1993).

Hasta aquí la evidencia solo sugiere que algún desconocido sistema colinérgico en el cerebro juega un papel importante en algunas formas de aprendizaje y memoria.

Figura 1



Representación esquemática del plano horizontal de los principales sistemas colinérgicos en el cerebro de mamíferos (modificado de Woolf, 1991). Como se observa en la figura, las neuronas colinérgicas centrales muestran dos esquemas organizacionales fundamentales: (a) circuito de células locales, ejemplificadas por las interneuronas del núcleo caudado-putamen, nucleus acumbens, tubérculo olfatorio y el complejo de islotes de Calleja (ICj) y (b) neuronas de proyección (i.e. aquellas que conectan a dos o más regiones diferentes). De las proyecciones de neuronas colinérgicas que se interconectan con estructuras centrales, han sido descritos dos subconstelaciones principales: (a) el complejo colinérgico del CAB compuesto por neuronas positivas a ChAT en el núcleo septal medial (ms), el núcleo de la banda diagonal (td), substancia innominata (si), campo preóptico magnocelular (pama), y el núcleo basalis (bas) y proyecciones a todo el telencéfalo no estriado y (b) el complejo colinérgico pontomesencefalotegmental compuesto por células inmunoreactivas a ChAT en el núcleo tegmental pendunculo pontino (tpp) y laterodorsal (dln) proyectando ascendente al tálamo y a otros sitios diencefálicos y descendente a la formación reticular (Rt) pontina y medular, núcleo profundo cerebelar (DeC) y vestibular (Ve) y núcleo del nervio cranial. No se muestran en este esquema las neuronas somáticas, parasimpáticas y otras eferentes colinérgicas de los nervios craneales 3-12 y las neuronas a and g-motoras autónomas de la columna espinal. Otras abreviaciones: amígdala (amyg), corteza anterior cingulada (ant cg), núcleo del nervio cranial dorsal (CrN), diencefalo (diencep), núcleo raquí dorsal (DR) corteza entorinal (ento) corteza frontal (frontal), corteza insular (ins), locus ceruleus (LC), núcleo lateral reticular (LR), olfatorio (olfact), corteza piriforme (pir), núcleo pantino (PN), corteza perirhinal (pr), corteza parietal (par), substancia nigra (SN), núcleo espinal del nervio cranial 5 (Sp5), corteza temporal (temporal), corteza visual lateral (vis lat), corteza visual media (visual med).

No existe sin embargo un acuerdo sobre los mecanismos fisiológicos subyacentes a las deficiencias observadas tras el bloqueo inespecífico y generalizado de funciones colinérgicas centrales. En realidad cualquier debate basado en este tipo de datos carecería de

fundamento debido a que parten de un virtual vacío anatómico. Siendo que prácticamente todo el eje neural se halla inervado por neuronas colinérgicas y los receptores muscarínicos se distribuyen a todo lo largo y ancho del sistema nervioso (Woolf, 1991), queda claro que los mecanismos fisiológicos mediados por acetilcolina se hallan involucrados en un gran número de funciones nerviosas centrales (ver figura 1).

De este modo, si bien no hay duda alguna de que los agentes muscarínicos afectan un amplio espectro de conductas aprendidas, las características de la anatomía colinérgica central implicarían que cualquier intento de dar una explicación unificada sobre la base de datos farmacológicos carecería de justificación.

En la región adyacente a la zona ventral del globus pálidus existe un grupo de grandes células cuya fuerte actividad de colinacetiltransferasa (ChAT) y colinesterasa (ChE) les identifica como neuronas colinérgicas (Abdulla, Abu-Bakra, Calamicini, Stephenson & Sinden, 1995). A esta zona se le conoce en su conjunto como la región basal del cerebro anterior, el cual incluye el Nucleus Basalis Magnocellularis, considerado, este último, como la estructura homóloga al núcleo basal de Meynert en humanos (Everitt et al., 1987).

Se ha establecido con bastante claridad que la principal inervación colinérgica hacia la neocorteza y otras regiones del cerebro involucradas en funciones cognitivas, procede precisamente de los somas colinérgicos de la región basal del cerebro anterior (Hebb, Krnjević & Silver, 1963; Everitt, Sirkia, Roberts, Jones & Robbins, 1988; Bigl, Woolf & Butcher, 1982; Wainer & Mesulam, 1990; Butcher, Woolf, Edwards & Roghani, 1992; Bronzetti et al., 1993)(figura 1).

Este sistema de proyección colinérgica ha atraído fuertemente la atención en la última década, debido a que alteraciones anatómicas de estas vías durante el envejecimiento han correlacionado fuertemente a la actividad colinérgica cortical con alteraciones en funciones asociativas en un gran conjunto de paradigmas o modelos

conductuales de aprendizaje y memoria (Perry et al., 1978; Collerton, 1986; Abdulla et al., 1995), implicando un involucramiento del sistema colinérgico ascendente basalo cortical en la regulación de las funciones de aprendizaje y memoria (para una revisión ver Sinden, 1995; Ammasauri, 1993; Hasselmo, 1995; Ikegami, 1994). Lo anterior ha dado lugar a lo que se conoce como la "hipótesis colinérgica de las disfunciones geriátricas de memoria", dos de cuyos conceptos más importantes podrían formularse del siguiente modo (Bartus, Dean, Beer & Lippa, 1982):

- a) El sistema colinérgico de la región basal provee una función esencial relacionada con un cierto numero de procesos cognitivos en particular aprendizaje y memoria.
- b) Las deficiencias en aprendizaje y memoria durante el envejecimiento son atribuibles, al menos en parte, a un decaimiento en la integridad funcional del sistema colinérgico de la región basal.

En su formulación inicial esta hipótesis fue propuesta en el contexto del envejecimiento normal, sin embargo, con base en evidencias clínicas y neuroanatómicas, se ha extendido esta hipótesis para incluir demencias seniles de tipo Alzheimer, un desorden caracterizado por un deterioro progresivo de funciones cognitivas, las cuales correlacionan con la pérdida de marcadores colinérgicos en la corteza y el hipocampo así como la pérdida y/o atrofia de las propias neuronas colinérgicas de la region basal.

Subsecuentes estudios basados en lesiones excitotóxicas en los núcleos colinérgicos de la region basal del cerebro anterior (Green, Halpern & Niel, 1970; Everitt et al., 1987; Arendt et al., 1989), manipulaciones farmacológicas localizadas, así como experimentos de trasplantes de tejido nervioso fetal procedentes del cerebro basal (Sinden, Hodges & Gray, 1995), han contribuido a aumentar la evidencia en favor de un involucramiento del sistema basal de proyección colinérgica en las funciones de aprendizaje y memoria. Con lo cual se ha conseguido asignar una identidad anatómica al

elusivo sistema colinérgico implícito en los anteriores enfoques farmacológicos.

Desde un punto de vista anatómico-funcional y específicamente en lo que respecta a los procesos de aprendizaje y memoria, se ha dividido tradicionalmente al sistema basal de proyección colinérgica en dos grandes ramas: El sistema de proyección septo-hipocámpal y el sistema basalo-cortical (Wainer & Mesulam, 1990; Frotscher & Naumann, 1992; Mallet, Beninger, Flesher, Jhamandas & Boegman, 1995).

Lesiones excitotóxicas de la región septal (que proyecta hacia el hipocampo) o bien de la región basal, incluyendo los brazos verticales y horizontales de la banda diagonal sustancia innominata, ansa lenticularis y nucleus basalis magnocelularis (que proyectan hacia la neocorteza) interfieren de manera independiente con las funciones asociativas mediadas, respectivamente por el hipocampo y la corteza (Sangstock et al., 1992; Sinden et al., 1995).

Tanto a un nivel anatómico grueso (la amplia inervación de numerosas regiones) como a niveles estructurales finos (múltiples contactos sinápticos involucrando varios tipos celulares), el sistema de proyección colinérgica parecería hallarse organizado de una manera difusa.

Evidencias en favor de un modo difuso de acción incluyen registros electrofisiológicos poblacionales en los que se ha observado que la región basal controla la generación de ritmos de actividad cortical e hipocámpal asociados con niveles de alerta conductual (ver Sinden et al., 1995). Dado que este tipo de ritmos pueden registrarse sincrónicamente en regiones extensas de la corteza o el hipocampo, se ha sugerido que el sistema de proyección colinérgica podría jugar un papel de tipo modulador sobre las funciones corticales e hipocámpales respectivamente, más que hallarse involucrado en la transmisión discreta de información neural. En este sentido se ha demostrado recientemente que la sola implantación cortical de fibroblastos genéticamente modificados para producir y liberar acetilcolina es suficiente para revertir las deficiencias cognitivas

observadas como resultado de lesiones excitotóxicas en los núcleos colinérgicos de la RBCA (Winkler, Shur, Gage, Thal & Fisher, 1995). Sin embargo, cabe insistir que aún se desconocen los mecanismos mediante los cuales la aferencia colinérgica basalo cortical promueve o regula las funciones de aprendizaje y memoria.

Capítulo Segundo

Factor de crecimiento neuronal y recuperación de deficiencias colinérgicas

Durante las etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso una determinada población de neuronas se genera en gran exceso con respecto a la población existente en el sistema adulto. Esta reducción neuronal asociada al desarrollo se lleva a cabo a través de un proceso conocido como muerte neuronal programada. Los trabajos ya clásicos de Hamburger y Oppenheim en el sistema periférico, mostraron que la magnitud de esta eliminación activa de neuronas depende de la extensión de la región de inervación. Esto es, la remoción temprana de tejido blanco da lugar a un incremento en la muerte neuronal mientras que la implantación temprana de tejido adicional la reduce. Estas observaciones dieron lugar a la idea de que 1) las regiones de inervación o tejidos blancos producen y proveen uno o varios factores "*neurotróficos*" necesarias para la *supervivencia* y el desarrollo de las neuronas involucradas; 2) Los receptores correspondientes unen, internalizan y transportan al factor desde la terminal nerviosa hacia el soma en donde se lleva a cabo la

transducción de la señal para iniciar los procesos celulares involucrados en la supervivencia neuronal.

El factor de crecimiento neuronal (NGF) fue el primero de los factores neurotróficos descritos. Durante estudios de la influencia de células neoplásicas en el desarrollo de tejidos embrionarios, se observó un desarrollo anormal de neuronas simpáticas y ganglios sensoriales en las inmediaciones del tejido tumoral (Montalccini, 1987). Un subsecuente análisis del fenómeno reveló la existencia de un factor difusible, liberado por las células tumorales, como el responsable del crecimiento y proliferación anormal de estas neuronas. La posterior caracterización funcional y estructural del factor en cuestión permitió la identificación de una proteína que en su forma activa y madura consiste en un dímero formado por dos moléculas idénticas de 118 aminoácidos (Bradshaw, Blundell, Lapatto, McDonald & Murray-Rust, 1993). Si bien la presencia de este factor fué inicialmente detectada como uno de tantos productos aberrantes de una línea neoplásica, posteriormente se estableció que el NGF se sintetiza y libera naturalmente en las áreas de inervación de neuronas simpáticas y sensoriales del sistema periférico (ver Mannes et al., 1994).

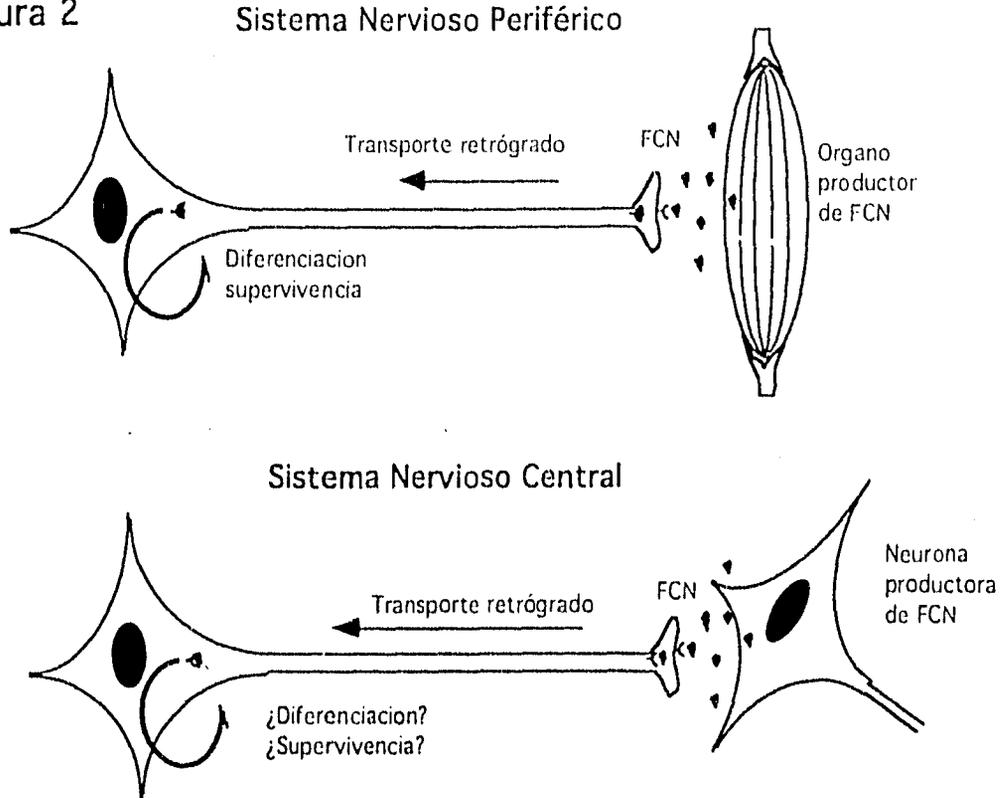
La mayoría de los estudios relacionado a factores neurotróficos han involucrado neuronas en estadios relativamente tempranos (perinatales) del desarrollo y específicamente del sistema nervioso periférico. No obstante lo anterior, ha resultado atractivo formular una hipótesis neurotrófica para el sistema nervioso.

De acuerdo con esta hipótesis, tanto el desarrollo como el posterior mantenimiento y supervivencia de *cualquier sistema neuronal* es constitutivamente dependiente de factores neurotróficos liberados por las células blanco correspondientes al sistema en cuestión (ver figura 2). A manera de corolario, de lo anterior se seguiría que la deficiencia en los niveles endógenos de factores neurotróficos habría de resultar en una correspondiente disfunción, atrofia y muerte neuronal; de allí que, la administración exógena de neurotrofinas en

condiciones de daño nervioso podría dar lugar a la consecuente reparación y recuperación funcional.

HIPOTESIS NEUROTROFICA

Figura 2



Con relación a esta hipótesis, en el sistema periférico se han demostrado tres funciones independientes para el factor de crecimiento neuronal (Montalccini, 1987):

i) *Actividad neurotrófica* La administración exógena de NGF protege a las neuronas embrionarias ganglionares de la muerte programada durante el desarrollo. Adicionalmente el NGF causa hipertrofia masiva de neuronas simpáticas en roedores neonatos. La administración directa de anticuerpos anti-NGF causa una dramática destrucción de ganglios simpáticos (inmunosimpatectomía).

ii) *Inducción de neuritas.* El NGF fue inicialmente identificado debido a su capacidad de inducir el crecimiento de procesos (fibras) neuronales. La inducción y elongación de neuritas puede entenderse como una expresión concomitante a la acción trófica del NGF. Sin embargo, experimentos posteriores han mostrado que la extensión de neuritas requiere de la acción directa del NGF sobre el cono axonal de crecimiento; la estructura neuronal a cargo del proceso de elongación. Mas aún, fuentes locales de NGF pueden guiar, no sólo la amplitud sino también la dirección del crecimiento neurítico.

iii) *Estimulación de neurotransmisión.* Las células nerviosas actúan sobre sus compañeras postsinápticas mediante la liberación de señales químicas específicas (acetilcolina, catecolaminas etc..). La disponibilidad de estos neurotransmisores depende a su vez de enzimas que los producen y degradan. Un tercer efecto del NGF es la estimulación de la producción de las enzimas responsables de la síntesis de los transmisores químicos.

El NGF fue durante mucho tiempo considerado un factor con efectos exclusivamente restringidos a un cierto conjunto de neuronas del sistema periférico. Sin embargo en los últimos años se ha documentado un posible papel para este factor en relación con ciertas neuronas del sistema nervioso central, específicamente el sistema colinérgico (Araujo, Chabot & Quirion, 1990). Las neuronas colinérgicas del sistema basal que proyectan hacia la corteza (Cuello, Maysinger & Garofalo, 1992) y del septum que, a través de la fimbria fornix proyectan hacia el hipocampo (Gage, 1990), así como las neuronas colinérgicas del estriado y el núcleo accumbens son capaces de reponder a la adición exógena de NGF y podrían de hecho depender del NGF endógeno como uno de sus factores neurotróficos (Varon, Hagg, Vahlsing & Manthorpe, 1989; Lindsay, Wiegand, Altar & DiStefano, 1994).

En favor de una posible conexión entre el NGF y los núcleos colinérgicos de la región basal del cerebro anterior se ha observado que:

a) El RNA mensajero para el NGF así como la propia proteína se encuentran presentes en la corteza y la formación hipocámpica; territorios de inervación del complejo colinérgico basal (Lindsay et al., 1994; Mannes et al., 1994).

b) NGF marcado radioactivamente, inyectado en la corteza y el hipocampo, se transporta retrogradamente hacia los cuerpos celulares colinérgicos de la región basal (Cuello et al., 1992; Mannes et al., 1994; Varon et al., 1989).

c) Estas neuronas colinérgicas muestran expresión de receptores de alta y baja afinidad para NGF (Vazquez & Ebendal, 1991; Holzman et al., 1995).

d) La administración exógena de NGF estimula la producción de colina acetiltransferasa (la enzima responsable de la síntesis de acetilcolina) en las neuronas colinérgicas centrales durante el desarrollo (Svendsen, Kew, Staley & Sofroniew, 1994; Birling & Price, 1995).

Como anteriormente se indicó, las neuronas colinérgicas de la región basal y sus proyecciones son componentes importantes de las actividades cognitivas mediadas por la corteza y el hipocampo y muestran una prominente degeneración durante el envejecimiento y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer; ambas condiciones acompañadas de deficiencias en procesos de aprendizaje y memoria. A este respecto, numerosos reportes han señalado que en condiciones de disfunción debidas a envejecimiento o lesión, las células colinérgicas del cerebro basal anterior son capaces de mostrar regeneración ante tratamientos crónicos de NGF exógeno (Cuello et al., 1992).

Estudios de recuperación de funciones asociativas corticales mediante transplantes fetales de tejido nervioso llevados a cabo en nuestro laboratorio, han mostrado una fuerte correlación entre la recuperación conductual y la reactivación colinérgica en el tejido transplantado, sugiriendo un papel esencial para la acetilcolina en el proceso de recuperación de lesiones corticales.

Dada la conexión existente entre el NGF y la regeneración colinérgica, se planteó la posibilidad de que este factor "trófico" pudiera estar

involucrado en la recuperación funcional mediada por los trasplantes corticales. En este sentido, subsecuentes experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, han demostrado que la adición de NGF exógeno a los trasplantes corticales fetales, no sólo estimula la recuperación de los niveles normales de actividad colinérgica local (comparado con animales normales) sino que también da lugar a una recuperación acelerada de las funciones asociativas. Esta clase de experimentos de regeneración de funciones colinérgicas en el contexto de alteraciones conductuales entre otros, han llevado a sugerir que las patologías neurodegenerativas podrían ser producto la inactivación funcional de neurotrofinas endógenas involucradas en la sustentación de sistemas neurales específicos. Sin embargo hasta la fecha no se ha podido determinar si el papel del NGF endógeno en el sistema colinérgico basal corresponde a un esquema neurotrófico o si se halla involucrado en alguna otra forma de regulación mas directa e inmediata (Minger & Davies, 1992; Palmer, Eriksson, Henschen, Ebendal & Olson, 1993). El potencial regenerativo del NGF sobre la función colinérgica hipocampal y cortical ha atraído fuertemente la atención hacia este factor, dado el importante papel que estas proyecciones parecen jugar en las funciones superiores de aprendizaje y memoria (Davies, 1992; Gage, 1995).

La clonación y secuenciación del NGF dio lugar a la subsecuente identificación de una familia de neurotrofinas (de las cuales el NGF forma parte) presentes en el cerebro, las cuales incluyen al factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF por sus siglas en inglés), y las neurotrofinas 3, 4 y 5 (NT-3, NT-4 y NT-5 respectivamente) (Mannes et al., 1994; Lindsay et al., 1994).

La hipótesis neurotrófica ha sido claramente confirmada en el sistema periférico, y se ha propuesto su validez para el SNC. Sin embargo, cabe aclarar que, si bien la presencia de NGF se halla indiscutiblemente establecida en el cerebro adulto, no existe hasta la fecha evidencia directa que demuestre la existencia de neuronas

centrales constitutivamente dependientes del NGF endógeno en condiciones fisiológicas normales (L. M. Maness, 1994; S. L. Minger y P. Davies, 1992). De lo anterior se sigue que el papel fisiológico de las neurotrofinas en el sistema nervioso central continúa en duda.

Por ejemplo: Mientras que en el sistema periférico, la administración de anticuerpos específicos anti-NGF da lugar a una notoria degeneración de células simpáticas y sensoriales (independientemente de la etapa de desarrollo en que se lleve a cabo el tratamiento), las neuronas colinérgicas centrales por su parte, muestran muy poco o ningún efecto cuando un tratamiento de bloqueo ocurre en etapas postnatales. Se ha sugerido que esto pudiera ser resultado de una defectuosa penetración de los anticuerpos a través del parénquima cerebral. Por otro lado recientemente se ha mostrado evidencia que sugiere que las neuronas colinérgicas centrales podrían depender del NGF para su supervivencia únicamente durante un periodo crítico de su desarrollo temprano (Svendsen et. al., 1994). Sin embargo recientemente se ha reportado que la infusión crónica de anticuerpos monoclonales directamente en el Septum medio da lugar a una significativa disfunción en el aprendizaje de la prueba de prevención pasiva y un decremento en la actividad de colin acetiltransferasa en el hipocampo (Nita et.al., 1993).

De acuerdo con la hipótesis neurotrófica (aplicada al sistema colinérgico), el NGF habría de sintetizarse en las células blanco de la region basal, esto es, neocorteza hipocampo, amígdala y otras estructuras, se uniría a sus receptores localizados en las terminales nerviosas y sería transportado en forma retrógrada hacia los somas neuronales de la región basal, en donde habrían de activarse los mecanismos correspondientes de sustentación. Sin embargo, recientemente se ha demostrado, mediante métodos neuroquímicos y morfológicos, que la destrucción masiva de células corticales y la supuesta reducción en la sustentación trófica derivada de la corteza, no parece tener impacto alguno en la viabilidad de las células colinérgicas de la region basal, cuestionando la validez de la hipótesis

neurotrófica para el sistema nervioso central (al menos en su formulación clásica). Mas aún, si bien la delección del gene de NGF en ratones da lugar a una marcada pérdida de neuronas sensoriales y simpáticas en etapas perinatales del desarrollo; las células colinérgicas de la region basal del cerebro se desarrollan y proyectan hacia sus areas de inervacion en forma normal (Crowly et al., 1994). Es necesario subrayar que la inmensa mayoría de los experimentos relativos a la influencia del NGF sobre el sistema colinérgico se centran en procedimientos de administración de NGF exógeno en modelos de lesión o disfunción colinérgica. Esta clase de experimentos no proveen información alguna sobre el papel del factor de crecimiento en el cerebro adulto en condiciones fisiológicas normales y, puesto que que las lesiones colinérgicas no se regeneran espontáneamente, ciertamente tampoco hay evidencia alguna en favor de un papel regenerativo para el NGF endógeno en condiciones naturales. La mayor expresión de NGF en el cerebro se concentra en el hipocampo y la corteza, sugiriendo una conexión entre este factor y las funciones corticales. El transporte retrógrado de este factor de la corteza hacia la región basal sugiere una conexión funcional entre el factor de origen cortical y la aferencia procedente del cerebro basal. Sin embargo a la fecha no existe evidencia directa alguna sobre la naturaleza de esta interacción.

La persistente supervivencia de las células colinérgicas basales a pesar de la masiva remoción de las células corticales encargadas de producir NGF, sugiere fuertemente que la conexión entre este factor y la aferencia basal *no corresponde a un esquema de tipo trófico*. ¿Podría haber algún otro modo de acción? A este respecto recientemente se ha observado que la adición de NGF da lugar a una modulación en la excitabilidad de neuronas septales aisladas, sugiriendo un involucramiento más activo de este factor a nivel electrofisiológico. Más recientemente, se ha mostrado que inyecciones intracerebroventriculares de anticuerpos anti-NGF en ratas, interfiere con las ramificaciones axonales de células musgosas (glutamatergias), asociadas con el desarrollo de la propagación

epileptogénica en modelos de kindling en hipocampo (Van-der-Zee et al., 1995).

En este trabajo trataremos de aportar información que permita esclarecer el significado funcional del NGF en el sistema nervioso central. En particular centraremos nuestra atención en el NGF de origen cortical y en su relación con la actividad colinérgica local: Para ello necesitamos un adecuado modelo cortical.

Capitulo Tercero

Un modelo cortical de funciones asociativas

La corteza insular (CI) representa un modelo con múltiples ventajas para el estudio de funciones asociativas. Esta región en ratas se define como un área que se extiende desde la corteza frontal lateral hacia la corteza perirhinal en la dirección rostro caudal y del límite ventral de la corteza somatosensorial hacia la corteza piriforme en la dirección dorsoventral. La corteza insular (areas 13 y 14 de krieg en ratas) ha sido considerada como una corteza visceral, dado que recibe información gustativa y visceral del tálamo y se sabe que se halla involucrada en reacciones viscerales y de tensión. Se ha propuesto que la corteza insular recibe aferencias límbicas con información sensorial primaria de un modo inusual con respecto a cualquier otra área sensorial de la corteza. Entre las conexiones de la corteza insular que podrían ser importantes en los procesos de memoria se encuentran los del sistema límbico, la amígdala, los núcleos dorsomediales del tálamo y la corteza prefrontal. La corteza insular y el núcleo central de la amígdala se hallan funcional y recíprocamente interconectados. Se ha sugerido que las conexiones corticales hacia la

amígdala, incluyendo las de la corteza insular, transmiten información de tipo cognitivo que a continuación se integra con procesos emocionales y motivacionales. Recientemente, también, se ha reportado el involucramiento de la corteza insular en procesos cognitivos en humanos.

Los primeros experimentos relativos al papel de la región insular en procesos asociativos iniciaron a principios de los años 70. En esos estudios se relacionó a la corteza insular con el aprendizaje (adquisición) y la retención de un modelo conductual conocido como "condicionamiento aversivo a los sabores" (CAS). El CAS es un simple pero robusto modelo conductual en el que los animales adquieren aversión a un determinado sabor cuando éste es seguido de un malestar gástrico. En este sentido las lesiones experimentales de la corteza insular producidas antes o después de la adquisición del CAS interfieren con este aprendizaje. Dado que se ha probado que estas lesiones no producen deficiencia alguna en la discriminación de sabores o en la sensibilidad gastrointestinal, parece claro que las lesiones de la región insular impiden la representación mnemónica de los sabores y/o de sus consecuencias gastrointestinales. Dicho en otras palabras la corteza insular, parece hallarse involucrada exclusivamente en los aspectos asociativos del CAS. Si bien en un principio los estudios en esta región se enfocaron en la representación mnemónica (engrama) de las asociaciones entre estímulos viscerales y estímulos gustativos, ahora es claro que esa región podría procesar un mas amplio espectro de condicionamientos conductuales, ya que las lesiones tanto reversibles como irreversibles de la corteza insular producen severos impedimentos en la adquisición de otros dos modelos de aprendizaje aversivo de tipo espacial conocidos como prevención pasiva y laberinto de agua.

En particular el CAS representa un modelo muy apropiado para el estudio de mecanismos de aprendizaje y memoria debido a que las estructuras neurales involucradas en este condicionamiento se

encuentran actualmente bien definidas (figura 3). La conexión existente entre la aferencia colinérgica basalo cortical y el CAS se estableció previamente en nuestro laboratorio cuando se encontró

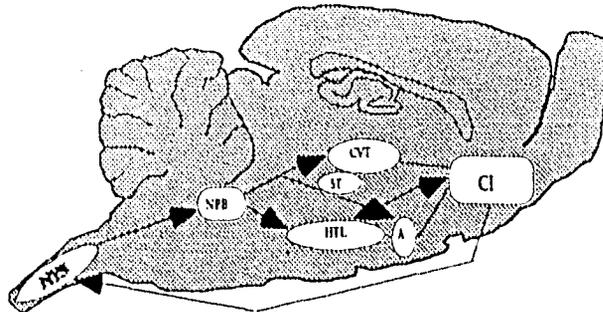


Figura 3 Esquema del corte sagital de un cerebro de rata en el que se muestran las principales conexiones de la corteza insular con otros núcleos del cerebro: (NTS) núcleo del tracto solitario, (NPB) núcleo parabraquial del puente, (CVT) complejo ventrobasal del tálamo, (ST) núcleo subtalámico, (HTL) hipotálamo lateral (A) amígdala y (CI) corteza insular.

que lesiones bilaterales con ácido quisquálico en el NBM evitan la adquisición del condicionamiento aversivo a los sabores e interrumpen la retención de la prueba (evocación) en animales previamente entrenados (Lopez-Garcia,1993). En lo que respecta a la actividad colinérgica específicamente en la corteza insular y su relación con el CAS durante el condicionamiento, resultados preliminares obtenidos mediante microdiálisis *in vivo* en nuestro laboratorio, muestran una significativa activación colinérgica en la corteza insular como respuesta a la presentación de un estímulo gustativo.

En base a lo anterior, se puede ver que la corteza insular representa un modelo adecuado para el estudio del papel fisiológico del factor de crecimiento neuronal de origen cortical, en sus respectivos aspectos bioquímicos, morfológicos y conductuales.

Capítulo Cuarto

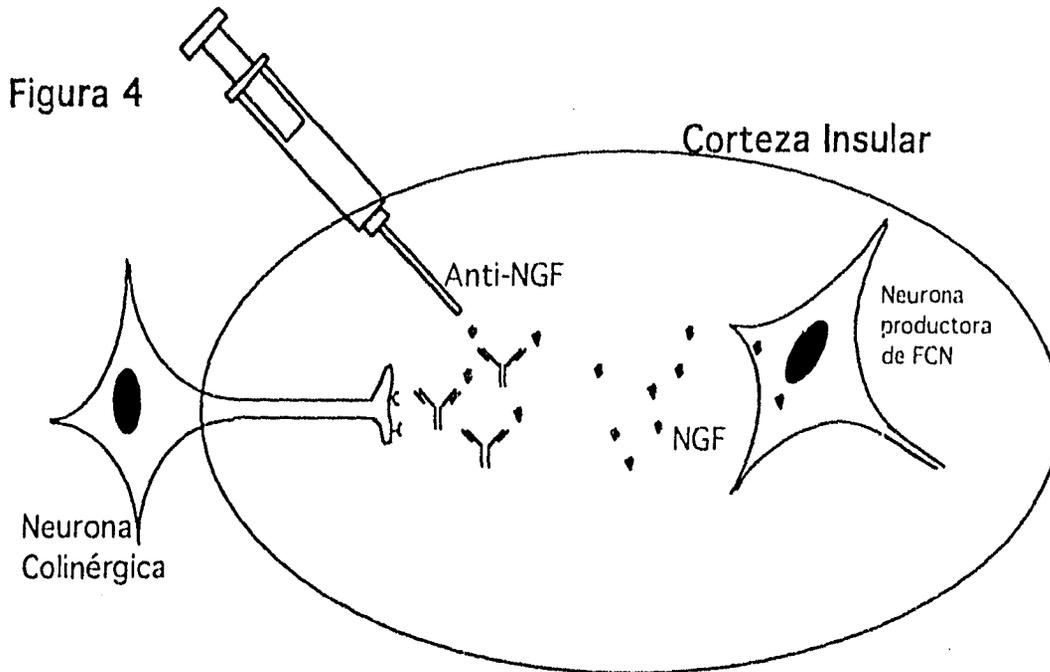
Objetivo

En el presente trabajo se hace un intento de esclarecer la función del NGF de origen cortical, específicamente en relación con la actividad colinérgica local y su correspondiente impacto al nivel conductual, particularmente en lo que respecta a los mecanismos asociativos mediados por la corteza.

Concretamente se trata de establecer si la función colinérgica de la corteza insular es o no constitutivamente dependiente de los niveles endógenos de un factor neurotrófico producido en la propia corteza en condiciones fisiológicas normales.

Una manera de determinar la importancia funcional del NGF con respecto a una población neuronal definida, sería mediante la supresión local de los niveles endógenos de NGF, haciendo uso de una estrategia de inactivación biológica. ¿Como? ... mediante anticuerpos monoclonales específicos anti-NGF. Por definición (atendiendo a la hipótesis neurotrófica) si un factor "neurotrófico" para una cierta población de neuronas no se encuentra disponible, esa población morirá.

Describiré pues una serie de experimentos en los que se analizarán los efectos de inyecciones locales de anticuerpos monoclonales anti-NGF directamente en la corteza insular (figura 4). Estos efectos serán determinados básicamente a tres niveles; bioquímico, histológico y conductual respectivamente.



Esquema de la estrategia general de bloqueo endógeno del factor de crecimiento neuronal mediante anticuerpos monoclonales específicos anti-NGF

Esta descripción se centrará principalmente en la sustancia de los experimentos llevados a cabo, omitiendo al máximo los detalles técnicos. El lector interesado en estos últimos queda referido al apéndice ubicado al final de este documento.

Capítulo Quinto

Inactivación cortical del factor de crecimiento neuronal

Bloqueo de NGF y actividad colinérgica.

Con objeto de determinar la relación existente entre el NGF de origen cortical y la actividad colinérgica local hicimos uso de inyecciones intra corticales de anti-NGF en combinación con la técnica de microdiálisis *in vivo*. Consiste esta última en la implantación de una pequeña sonda de microdiálisis en la región de interés, en nuestro caso, en la corteza insular. Una membrana de diálisis ubicada en el extremo de la sonda separa al medio externo del interior de la misma. Una solución de perfusión fluye de manera constante por el interior de la sonda (solución ringer, 2 microlitros por minuto). Si la membrana de diálisis así lo permite, cualquier sustancia que se halle en solución en el medio exterior (en este caso el parénquima cortical) por simple diferencia de concentraciones difundirá libremente a hacia el interior de la sonda. Gracias al flujo la muestra puede ser colectada continuamente fuera del tejido que se analiza.

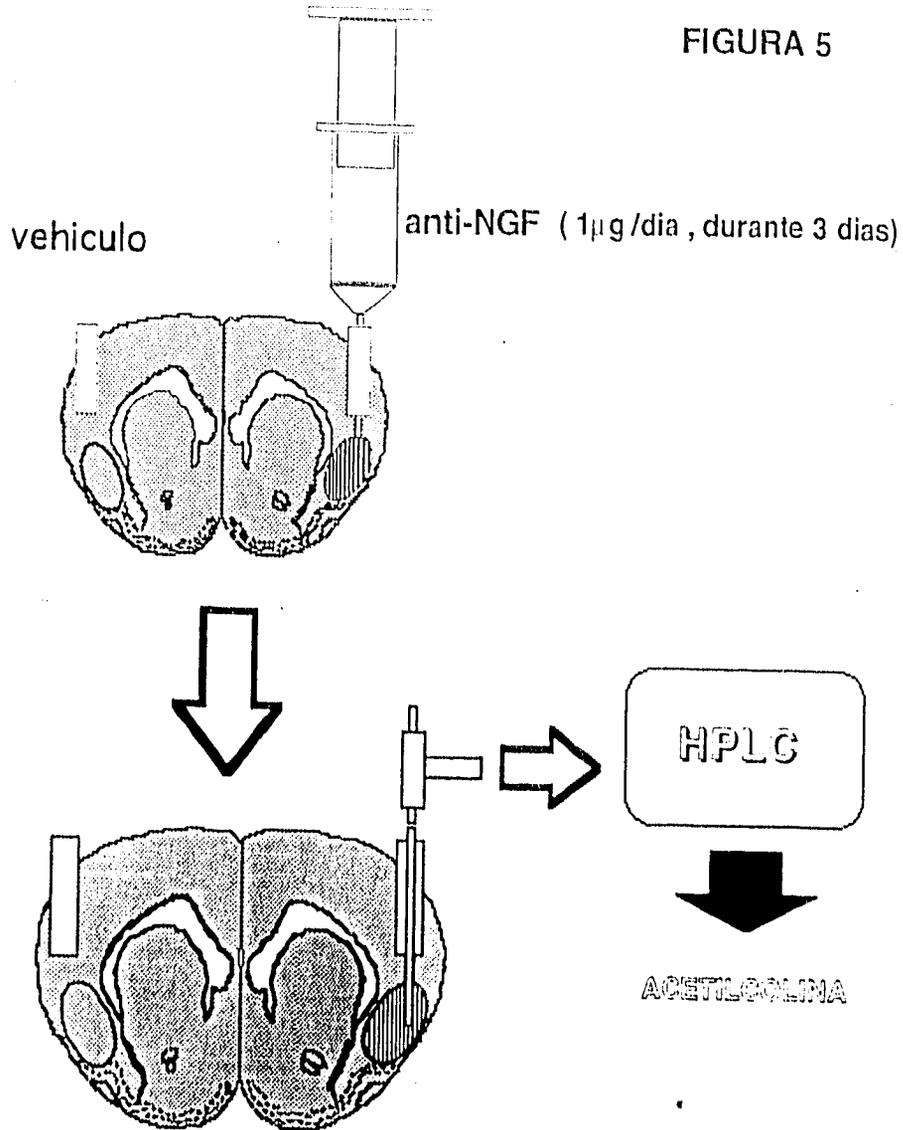
Este procedimiento permite muestrear compuestos (por ejemplo acetilcolina) presentes en el medio extracelular sin intercambio neto de volumen en el mismo. Un subsecuente análisis cuantitativo de las

muestras nos permitiría por lo tanto estimar los niveles fisiológicos de acetilcolina en el parenquima cortical.

La técnica de microdiálisis posee la gran ventaja de que nos permite obtener una medida confiable directa y sobre todo, fisiológica de la actividad colinérgica en una determinada región cerebral. Adicionalmente esta técnica nos permite llevarla a cabo en animales vivos y en libre movimiento. La identificación y cuantificación de la acetilcolina presente en las muestras obtenidas por microdiálisis se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en ingles) y detección electroquímica.

El principio es básicamente el siguiente: la acetilcolina presente en la muestra se descompone en colina y acetato debido a la acetilcolinesterasa presente en un reactor enzimático acoplado al cromatógrafo. Una segunda enzima, la colin oxidasa, descompone a su vez la colina, dando como resultado betaina y peróxido de hidrógeno. Siendo éste último un fuerte oxidante, al pasar frente a un electrodo se establece una pequeña corriente de electrones cuya intensidad (medida en miliamperios) es proporcional a la cantidad de peróxido generado.

FIGURA 5

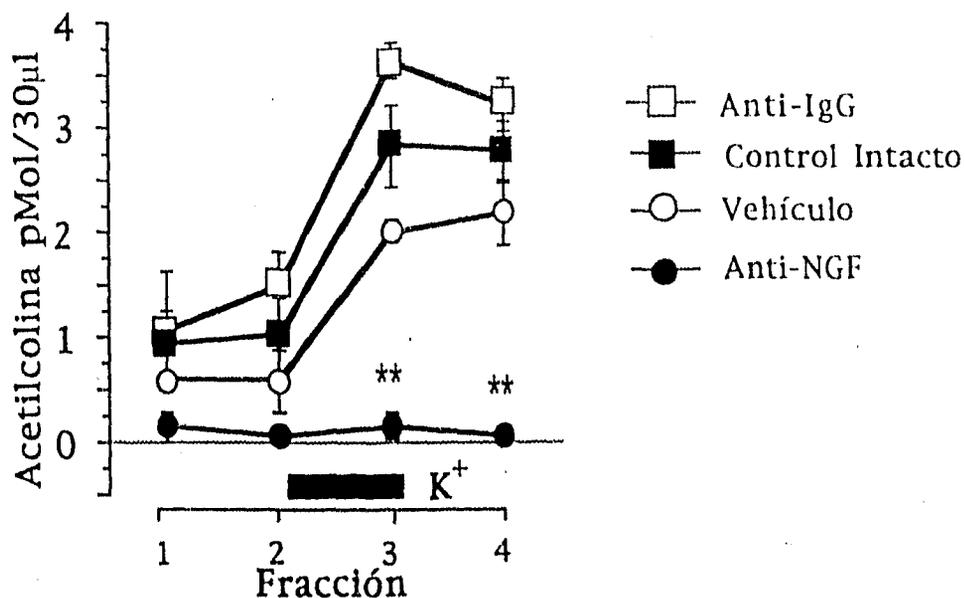


Dado que el peróxido es a su vez proporcional a la cantidad de acetilcolina presente originalmente en la muestra, este procedimiento permite la estimación cuantitativa del neurotransmisor en las muestras obtenidas por microdiálisis.

Con esta herramienta a mano diseñamos el siguiente protocolo (figura 5): Cinco animales fueron implantados bilateralmente con guías cánula para microdiálisis dirigidas hacia la corteza insular. Cada animal recibió un total de tres microinyecciones en cada hemisferio

(una inyección diaria durante tres días). Cada inyección fue de un microgramo de anticuerpo anti-NGF, (1 microgramo/microlitro). El hemisferio contralateral recibió el correspondiente tratamiento de vehículo. El objetivo de este arreglo era que cada animal constituyera su propio control durante el estudio de microdiálisis *in vivo*. Los resultados mostrados en la figura 6 incluyen un grupo de cuatro animales que fueron implantados unilateralmente y no recibieron tratamiento alguno (control intacto).

Figura 6



Liberación extracelular de acetilcolina en el parénquima de la corteza insular en las condiciones experimentales indicadas (ver texto) la barra indica la adición de 56 mM de KCl. * $p < 0.05$ vs. control. ANOVA con post hoc de Fisher.

La adición de cloruro de potasio en concentración 56 mM a la solución de perfusión, tiene por objeto estimular la liberación de acetilcolina en la región analizada.

Como se muestra, el tratamiento utilizado da lugar a una clara disminución en los niveles basales de acetilcolina y ninguna respuesta a la estimulación por KCl únicamente en el hemisferio que recibió el tratamiento de bloqueo anti-NGF, no así en lo que respecta

al hemisferio que recibió el tratamiento control (vehículo), el cual por su parte registra la misma activación colinérgica que la observada en la corteza de los animales intactos.

Puede mostrarse que la disminución colinérgica observada se halla asociada a la especificidad del anticuerpo anti-NGF dado que una aplicación equivalente de un anticuerpo policlonal con una especificidad distinta (anti IgG de ratón, $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$), no muestra alteración alguna tanto en sus niveles basales como en la respuesta a la estimulación con potasio.

La gráfica muestra la concentración de acetilcolina con respecto al número de fracción analizada (cuatro muestras sucesivas en total).

Por razones de brevedad se muestran únicamente las fracciones inmediatamente anteriores y posteriores a la adición de KCl. Sin embargo cabe aclarar que, para el caso de los grupos controles, los niveles basales de liberación de acetilcolina se recuperan en las subsiguientes fracciones.

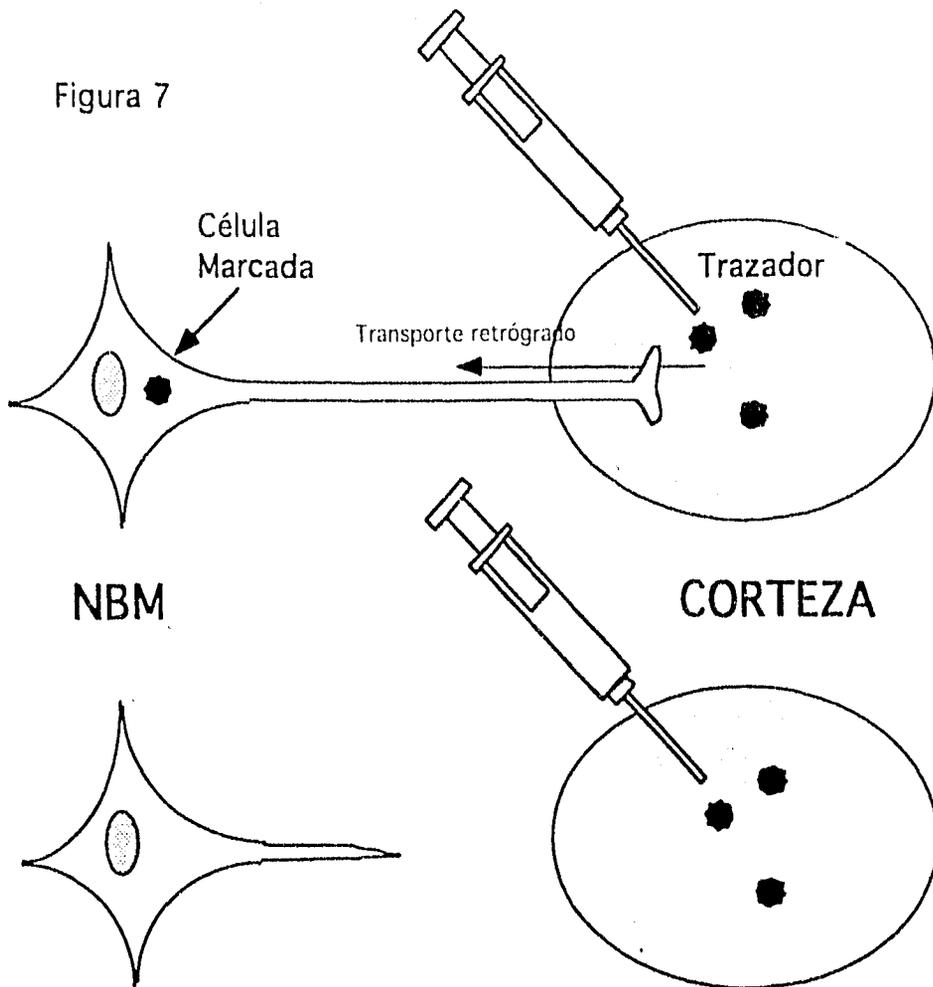
¿Quién responde al NGF?

Se cree que, en animales adultos, el NGF podría hallarse involucrado en el mantenimiento neuronal. Por otra parte como ya se indicó, la expresión del receptor de NGF se encuentra restringido básicamente a los núcleos *colinérgicos* basales del cerebro anterior: Septum, Banda Diagonal y *Nucleo Basal Magnocelular* (NBM).

Si la hipótesis del mantenimiento es correcta, entonces la inactivación cortical del NGF endógeno debería dar lugar a una degeneración de las aferentes *colinérgicas* procedentes del NBM.

Una manera de probar esta hipótesis sería analizando el efecto del bloqueo cortical del NGF sobre el estado de las proyecciones hacia la corteza en particular las proyecciones colinérgicas.

Figura 7



En condiciones normales, el trazador inyectado en la corteza se moviliza hacia el soma gracias al transporte retrogrado axonal. Como resultado de ello los somas neuronales del NBM que proyectan hacia la corteza resultarían marcados. Cualquier alteración en la conectividad de estas neuronas daría como resultado una ausencia de señal retrograda en los somas de la región basal.

Un procedimiento para analizar la integridad de estas proyecciones es aprovechando la propiedad que tienen las neuronas de internalizar ciertas sustancias a través de las terminales (endocitosis) y transportarlas hacia el soma neuronal en sentido retrógrado (figura 7). De este modo si una sustancia de éstas (trazador retrógrado) se coloca en el área de proyección de las neuronas de nuestro interés, el trazador puede ser posteriormente detectado en la región de donde procede. Si por alguna razón esta conectividad se

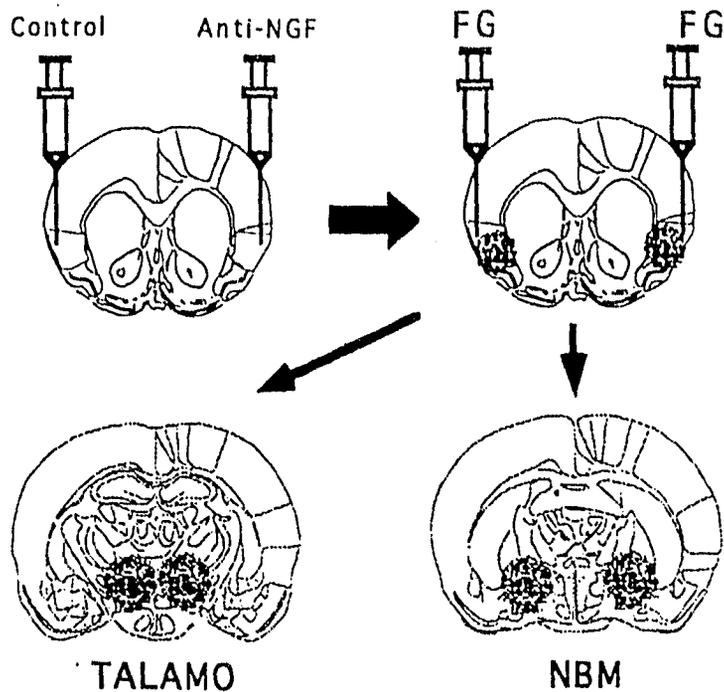
afecta el trazador retrogrado no podría ser transportado a dicha región.

Con base en lo anterior llevamos a cabo el siguiente experimento:

Cinco animales fueron implantados *bilateralmente* con cánulas dirigidas hacia la corteza insular, y tratados *unilateralmente* con el procedimientos de bloqueo (Anti-NGF, 1µg/día. durante 3 días). El hemisferio contralateral recibió únicamente inyecciones de solución ringer (figura 8).

Transcurridos 15 días a partir de la primera aplicación los animales recibieron una inyección bilateral en la corteza insular de un trazador retrógrado fluorescente (FluoroGold).

Figura 8



Estrategia experimental utilizada en la determinación del efecto en la conectividad como resultado del bloqueo cortical del factor de crecimiento neuronal. FG=fluorogold.

NBM=Núcleo Basal Magnocelular.

Adicionalmente, cinco animales intactos (controles) recibieron una inyección unilateral del trazador.

Cuatro días después, los 9 animales fueron perfundidos y los cerebros removidos para su análisis histológico.

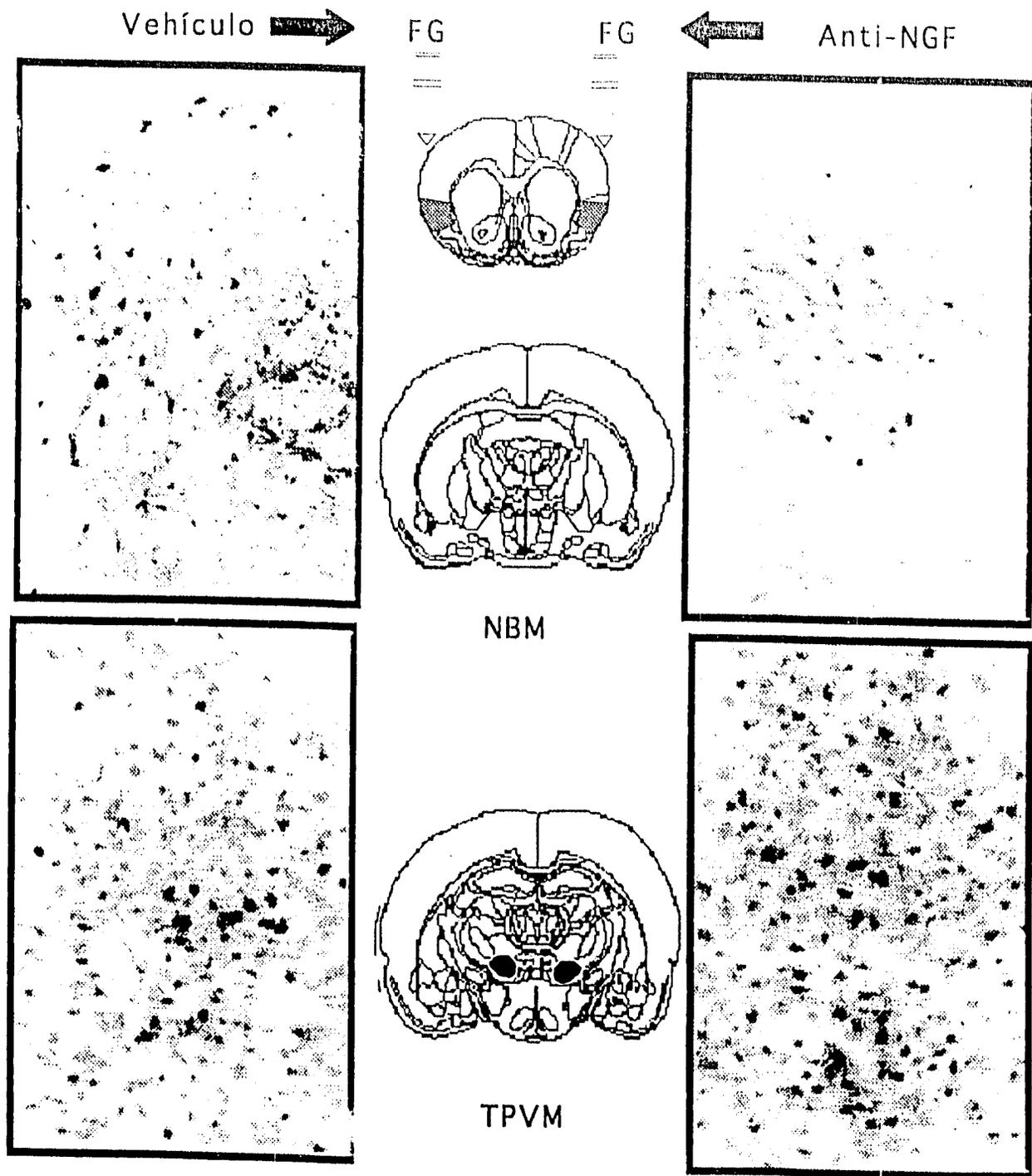
La determinación de densidad de células marcadas con fluorescencia se llevó a cabo mediante conteo sobre un área definida de 0.5 mm² para el NBM y 0.125 mm² para el núcleo postero-ventro-medial del tálamo (TPVM, estructura responsable de las proyecciones talámicas hacia la corteza insular).

En condiciones normales (hemisferio control y animales intactos), las células marcadas aparecen en la región basal del cerebro anterior en la región ipsilateral al sitio de inyección del trazador. Su ubicación se restringe básicamente al sector rostral del NBM a lo largo del borde medial del globus pallidus extendiéndose hasta la sustancia innominata. Dado que la corteza insular incluye a la neocorteza gustativa, que recibe aferentes del área gustativa del tálamo; un gran número de células marcadas se observaron en este último núcleo (ver figura 9).

La figura 10(a) muestra los resultados del análisis de conteo para el núcleo talámico. Como puede verse tanto en el hemisferio tratado como en el contralateral no tratado y el control intacto no se observan diferencias apreciables, indicando que en todos los casos las proyecciones talámicas no resultaron afectadas.

Por el contrario en la figura 10(b) se muestra, para el NBM, una drástica disminución en la densidad de células marcadas únicamente en el hemisferio que recibió el tratamiento de bloqueo lo cual indica que las proyecciones basalo-corticales se hallan afectadas, presumiblemente debido a una degeneración de las terminales axónicas, procedentes de este núcleo, que hacen blanco en la corteza insular.

Fig 9



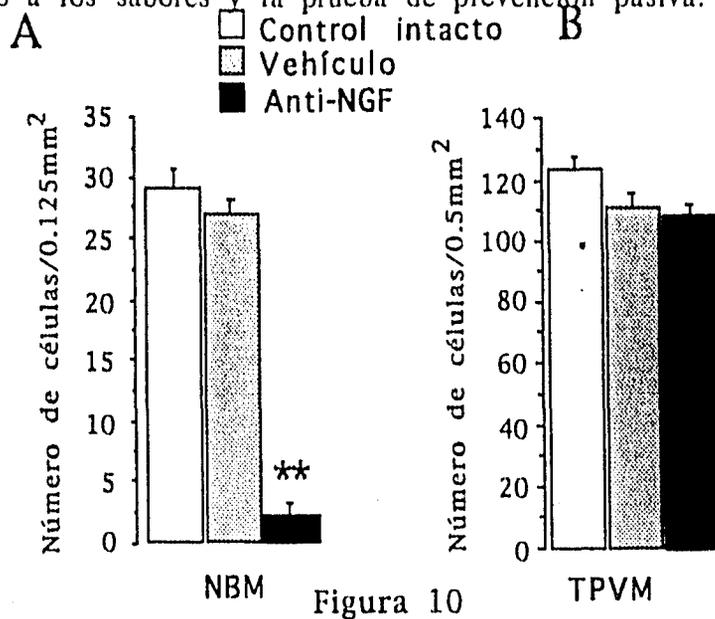
Marcado de células fluorescentes (filtro negativo) en la región basal NBM y el núcleo talámico ventromedial TPVM. Las cuatro tomas mostradas corresponden a un mismo cerebro

Los resultados descritos hasta este momento sugerirían que tanto la actividad colinérgica cortical en animales adultos así como la conectividad física entre la corteza y la región basal del cerebro anterior es fisiológica y activamente dependiente de los niveles de NGF generados en la propia corteza.

Resultados conductuales

La supresión de la actividad colinérgica observada como resultado del bloqueo cortical del NGF por un lado y la conocida asociación entre la actividad de este neurotransmisor (la acetilcolina) y los mecanismos cognitivos mediados por la corteza por el otro; implicarían un efecto conductal concomitante a la inactivación endógena del NGF.

Con la intención de demostrar esto último, utilizamos dos pruebas conductuales en las que, como ya se indicó (capítulo tercero), se sabe que la corteza insular se encuentra involucrada: el condicionamiento aversivo a los sabores y la prueba de prevención pasiva.



A) Número de células marcadas con el trazador fluorescente en el tálamo posteroventromedial. B) Número medio de células marcadas en la región basal. * $p < 0.01$. ANOVA con post hoc de Fisher.

El procedimiento experimental utilizado para medir la capacidad que tienen los animales para adquirir la aversión a sabores (CAS) consiste básicamente en lo siguiente (ver figura 11):

Se somete a los animales a privación de agua, permitiéndoles beber solo una vez al día de manera regular. Esto nos permite establecer la línea base de consumo diario de agua. Transcurridos un cierto número de días en esta condición (los necesarios para estabilizar la línea base), el día del entrenamiento simplemente se presenta -en vez de agua- alguna solución acuosa de algún estímulo gustativo novedoso, por ejemplo una solución de sacarina o bien de cloruro de sodio. Los animales beben de cualquier modo esta solución debido a la privación en la que se encuentran. Veinte o treinta minutos después de que los animales han bebido el nuevo estímulo, cada uno recibe una inyección intraperitoneal de cloruro de litio, como resultado de la cual, los animales experimentan un fuerte malestar gástrico. Para probar la aversión al sabor que los animales han adquirido, simplemente se vuelve a privar a los animales, se reestablece la línea base de consumo, y nuevamente se substituye el agua por la solución utilizada anteriormente. La aversión en los animales se refleja en una correspondiente disminución del consumo de líquido, no obstante la privación en la que se encuentran.

Este condicionamiento se adquiere muy fácilmente en un solo evento de asociación, es extremadamente claro y el tiempo transcurrido entre la sesión de adquisición y la prueba puede ser arbitrariamente largo. Adicionalmente se pueden inducir varios condicionamientos simultáneos e independientes utilizando diferentes estímulos gustativos.

Las lesiones experimentales de la corteza insular interfieren con el desempeño de esta prueba .

La prueba de prevención pasiva es por su parte un condicionamiento aversivo de tipo espacial. Se utiliza una pequeña cámara con dos compartimentos uno iluminado y otro oscuro (ver fig 12), separados mediante una compuerta. En el suelo del compartimento oscuro hay una placa metálica a través de la cual se aplica corriente eléctrica.

CAS

ADQUISICION

PRUEBA

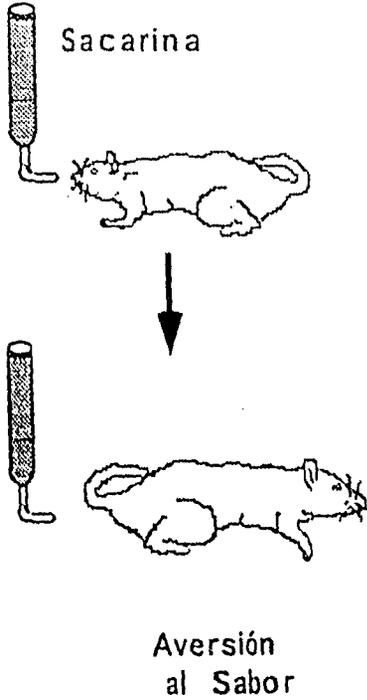
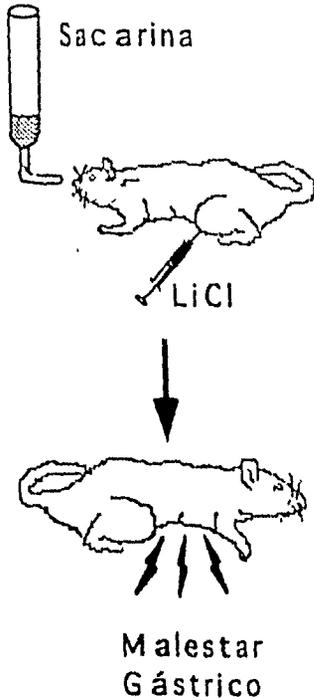


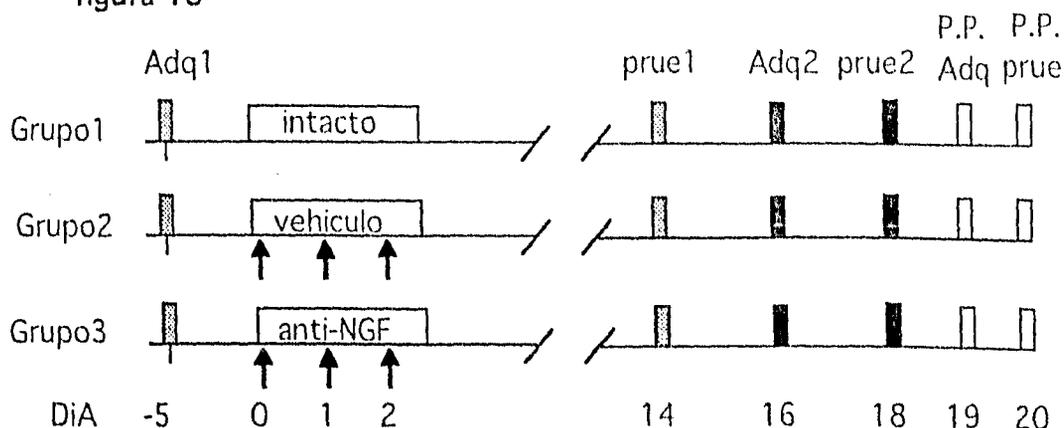
fig 11

Se coloca al sujeto durante algunos segundos en el compartimiento claro. Al abrir la compuerta, debido a que las ratas son fotofóbicas, el animal normalmente se desplaza hacia el compartimiento oscuro, se cierra nuevamente la compuerta y se aplica un inevitable choque eléctrico, tras lo cual se libera nuevamente al animal. Al día siguiente se vuelve a colocar al animal en el compartimiento claro, se abre la compuerta y se registra el tiempo que tarda el animal en entrar nuevamente a la zona oscura (latencia). Un animal normal simplemente no entrará; por otro lado, un animal con algún tipo de disfunción cognitiva se desplazará nuevamente al compartimiento oscuro en forma casi inmediata.

Nuevamente, las lesiones bilaterales de la corteza insular afectan esta prueba.

Utilizando estas dos pruebas hemos diseñado el protocolo que se muestra en la figura 13. Tanto el grupo experimental (n=8) como un segundo grupo control (n=8) fueron implantados bilateralmente con pequeñas cánulas metálicas dirigidas hacia la corteza insular. El grupo experimental recibió durante tres días una inyección bilateral de 1 µg de anti-NGF (1µg/µl), el segundo grupo recibió el mismo tratamiento con la diferencia de que las inyecciones fueron únicamente del vehículo utilizado (solución Ringer). Hubo además un tercer grupo (n=8) de ratas intactas (control intacto).

figura 13



Curso temporal de las manipulaciones llevadas a cabo durante los experimentos conductuales descritos. Las flechas indican las aplicaciones intracorticales de vehículo ó anti-NGF según se indica. Abreviaturas: Adq= sesión de adquisición, Prue= sesión de prueba, P.P.=prevención pasiva.

La utilización de dos estímulos gustativos diferentes para inducir aversión nos permite examinar el efecto del bloqueo sobre el aprendizaje (adquisición) y la retención (evocación) en forma independiente

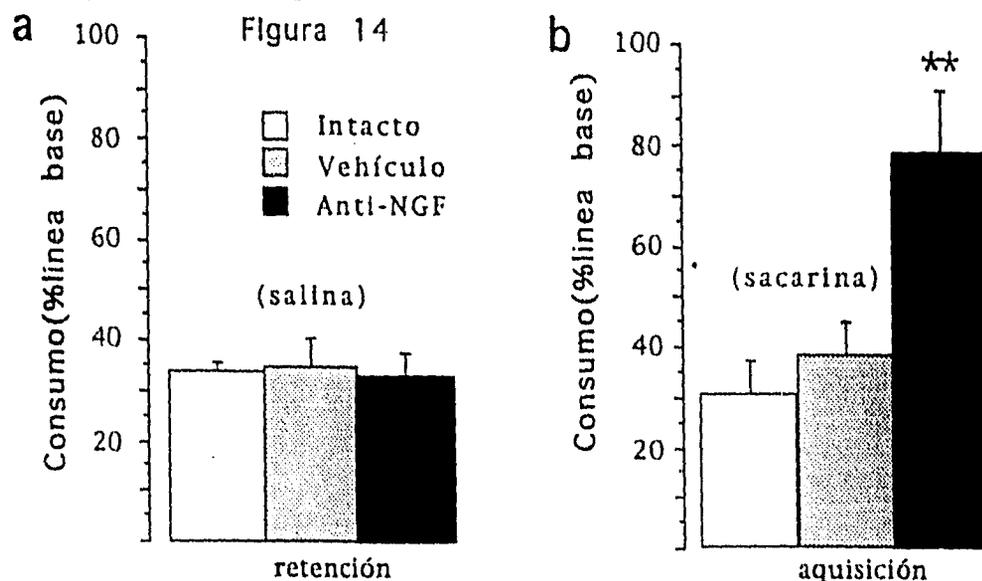
Como se ve en el esquema, la sesión de adquisición I (CAS-I), al llevarse a cabo previo al procedimiento de bloqueo, el cual se verifica quince días antes de la sesión de prueba correspondiente, permite establecer el efecto del tratamiento sobre la función de memoria. Un subsecuente entrenamiento, esta vez mediante un segundo estímulo gustativo (adquisición II), seguido de su correspondiente prueba, permite por su parte establecer el efecto del bloqueo sobre la función de aprendizaje (CAS-II).

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 14. En la figura se observa que el tratamiento no pareció tener efecto significativo en el recuerdo del condicionamiento previamente adquirido comparado con el grupo control intacto (panel A).

En lo que respecta a la prueba de la capacidad de aprendizaje, en el panel B se observa una clara ausencia de aversión por parte de los animales que recibieron el procedimiento de bloqueo anti-NGF.

Aparentemente el tratamiento con el anticuerpo monoclonal dió lugar a un claro déficit en la capacidad de aprender el condicionamiento aversivo a los sabores. Por otro lado el mismo tratamiento no muestra efecto alguno sobre la retención o capacidad de evocar el condicionamiento previamente adquirido.

La prueba de prevención pasiva se llevó a cabo inmediatamente después de finalizadas las pruebas de CAS. Como se observa en la figura 15 el tratamiento de bloqueo dió lugar a un claro déficit en el desempeño de esta prueba.



Prueba de retención (a) y aprendizaje (b) del condicionamiento aversivo a sabores en las condiciones experimentales indicadas. * $p < 0.05$ con respecto al control intacto, (ANOVA con post hoc de Fisher).

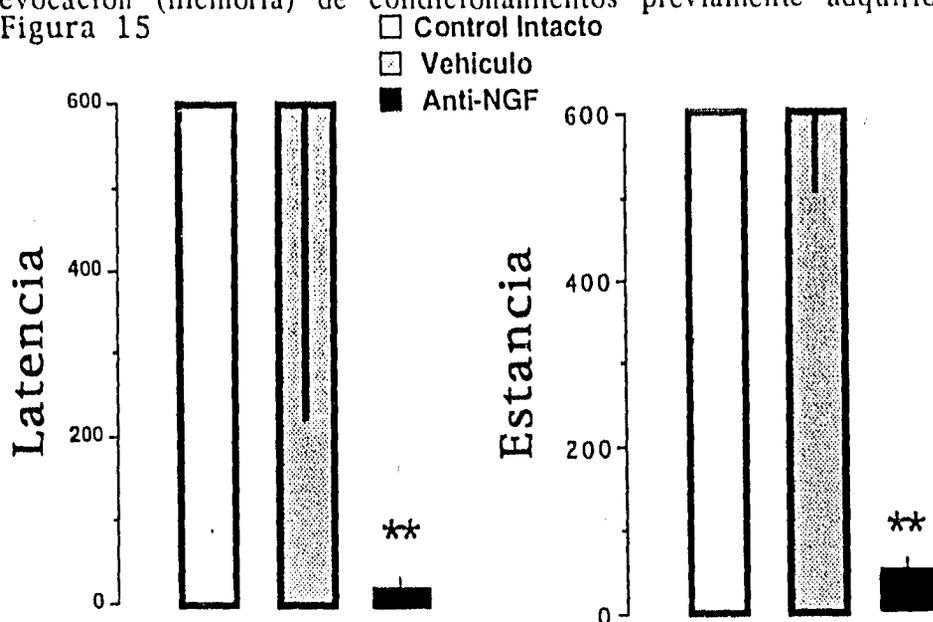
Una posible explicación a este último resultado es que el tratamiento provocó una disminución en el umbral de sensibilidad a los choques electricos en los animales tratados con anticuerpos anti-NGF. Un subsecuente análisis de sensibilidad aplicado a los tres grupos mostró que este no era el caso.

Con base a los resultados conductuales podemos concluir que:

II.- El efecto de este bloqueo incluído probablemente la inactivación colinérgica, da como resultado un déficit en el desempeño de las funciones de aprendizaje propias de la corteza insular: condicionamientos con base a estímulos gustativos y prevención pasiva.

III.- El efecto de este bloqueo, incluída la inactivación colinérgica, carece de efecto en lo que respecta a la función de retención y/o evocación (memoria) de condicionamientos previamente adquiridos.

Figura 15



Prueba de aprendizaje de la prevención pasiva utilizando dos criterios: Latencia de cruce al lado obscuro y estancia total en el lado claro. * $p < 0.05$. Kruskal-Wallis y U de MannWhitney con respecto al control.

Capítulo Quinto

Conclusión

Una amplia evidencia psicofarmacológica sugiere que la transmisión colinérgica juega un papel importante en las funciones de memoria. Administración de atropina y escopolamina, antagonistas de la transmisión colinérgica, se ha observado que impiden el aprendizaje en numerosas pruebas (ver. Hasselmo, 1993; Dunnett & Fibiger, 1993; Nabeshima, 1993). Adicionalmente, los déficits de memoria asociados con la enfermedad de Alzheimer, se ha sugerido que resultan de una pérdida de la inervación colinérgica cortical. Recientemente se han desarrollado modelos explícitos tendientes a explicar el papel de la inervación colinérgica en los mecanismos de almacenamiento cortical de información sensorial (M.E. Hasselmo;1992). Se ha establecido claramente que el principal origen de inervación colinérgica en la neocorteza lo constituye el *Núcleo Basal Magnocelular* (Bigl et al., 1982).

La región basal del cerebro anterior (RBCA) es responsable de hasta el 95% de la actividad colinérgica observada en la corteza cerebral (Abdulla et al., 1995). La organización topológica de las proyecciones colinérgicas de la región basal es compleja. Los estudios histológicos

llevados a cabo a la fecha indican que las neuronas pertenecientes al NBM, la substancia innominata subpalidal y el ansa lenticularis, proyectan rostrocaudalmente y en forma difusa hacia la corteza frontal parietal y temporal. Por su parte las principales aferencias colinérgicas a la amígdala provienen de la banda diagonal incluyendo al núcleo preóptico magnocelular, el area preóptica lateral y el lecho del núcleo de la estria terminalis (Björklund, Hökfelt & Kuhar, 1984). Lesiones excitotóxicas de la region basal producen alteraciones en una gran gama de tareas conductuales.

Existe un acuerdo generalizado en el hecho de que la expresión del receptor para NGF se restringe básicamente a la región *basal del cerebro anterior* (Imaizumi et al., 1991; Holzman et al., 1995; Urschel & Hulsebosch, 1992; Vazquez & Ebendal, 1991), mientras que otros grupos neuronales colinérgicos y no colinérgicos carecen del receptor para NGF en animales adultos. Se ha observado que la adición de NGF, previene la atrofia de neuronas colinérgicas axotomizadas de la vía septo-hipocampal *in vivo*. Como ya se mencionó, cuando se administra NGF en ratas viejas con impedimentos en habilidades de aprendizaje, eleva los niveles de colin-acetil-transferasa, incrementa el tamaño de las neuronas *colinérgicas basales* y mejora las pruebas de *memoria* (Fisher, 1994; Hefti, 1986; Lindsay et al., 1994; Ogawa, Nabeshima, Kameyama & Hayashi, 1993). Sin embargo no existe ninguna evidencia de que estos procesos ocurran naturalmente en el sistema nervioso central, de allí que el papel del NGF endógeno en las funciones fisiológicas normales sigue siendo algo obscuro (Nita et al., 1993), para una revisión (Mannes et al., 1994).

Nuestros experimentos fueron diseñados para esclarecer en que medida la función colinérgica de las neuronas de la región basal del cerebro anterior que proyectan hacia la corteza insular en las ratas adultas podrían ser constitutivamente dependientes de un factor trófico producido y liberado en la corteza en condiciones fisiológicamente normales.

Un modo de determinar la importancia neurotrófica con respecto a esta actividad colinérgica sería mediante la supresión local de los niveles endógenos de NGF. El uso de anticuerpos específicos anti-NGF se ha propuesto en repetidas ocasiones como una estrategia idónea para determinar la participación de este factor en determinados procesos plásticos del sistema nervioso (Springer & Loy, 1985; Vantini et al., 1989; Urschel & Hulsebosch, 1992; Nita et al., 1993; Svendsen, Kew, Staley & Sofroniew, 1994; Van-der-Zee et al., 1995). El uso de esta estrategia descansa en la suposición de que la interacción entre el anticuerpo y el NGF (o alguna otra molécula estrechamente emparentada) interfiere con la unión de este factor por su receptor; resultando de este modo en una inactivación funcional del mismo.

La infusión cortical directa de anticuerpos monoclonales anti-NGF resulta en una dramática disminución en los niveles extracelulares de acetilcolina, según se determinó mediante la técnica de microdiálisis *in vivo*. Dado que el sistema basal constituye por mucho el principal sistema de proyección colinérgica hacia la corteza, es muy probable que sea precisamente esta aferencia la que ha sido afectada por el tratamiento de bloqueo. Utilizando pequeñas inyecciones del neurotrazador FluoroGold, hemos encontrado una correspondiente interrupción en la conectividad existente entre la corteza insular y complejo colinérgico basal ipsilateral al parénquima tratado con anti-NGF, mientras que el hemisferio control mostró cantidades normales de células marcadas. Este efecto en la conectividad parece restringirse al cerebro basal, dado que las proyecciones talámicas permanecieron intactas tanto en el hemisferio tratado como en el control. Estos resultados en su conjunto sugieren que la proyección colinérgica así como la conexión física entre la corteza y el cerebro basal son continuamente dependientes del NGF de origen cortical en el cerebro adulto normal.

Se ha documentado claramente que las lesiones de corteza insular interrumpen la adquisición y la retención del CAS (Benjamin & Pfaffman, 1955). Se ha demostrado también que la corteza insular se halla involucrada en la adquisición y consolidación de algunas formas

de aprendizaje espacial (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni, Introini-Collinson & McGaugh, 1991), por otro lado las lesiones excitotóxicas del NBM se ha visto que impiden la adquisición y retención del CAS y muchas otras conductas aprendidas, incluyendo la prueba de prevención pasiva (López-García, Fernández-Ruiz, Escobar, Bermúdez-Rattoni & Tapia, 1993).

Si la proyección del NBM hacia la corteza es constitutivamente dependiente del NGF cortical, entonces inyecciones locales de anti-NGF debiera dar lugar a un déficit detectable en la habilidad de aprender el CAS y la prevención pasiva.

En nuestro estudio conductual el tratamiento anti-NGF resulta en un marcado impedimento en la adquisición del CAS y la prevención pasiva, sin embargo nuestros resultados también muestran que independientemente de los hallazgos bioquímicos e histológicos no hubo diferencias entre los animales que recibieron el procedimiento de bloqueo y los animales intactos en lo que respecta a su capacidad de retener el CAS cuando este fué adquirido previo al tratamiento. Esto es, no muestran ninguna deficiencia en su capacidad de evocar. Este resultado claramente sugiere que la actividad colinérgica dependiente del NGF, no se requiere durante el proceso de retención o memoria en esta prueba conductual.

Los resultados de este estudio extienden trabajos previos en los cuales se ha investigado los efectos de tratamientos anti-NGF en el sistema nervioso central. Si bien la administración fetal de antisuero anti-NGF se ha visto que reducen la población de células colinérgicas en el septum, el hipocampo y el núcleo basal; los resultados han sido contradictorios o muy pobres cuando los tratamientos ocurren en el animal adulto (Vantini et al., 1989 y Mannes et al., 1994). Podría suceder, sin embargo que, dado que estos tratamientos han sido intraventriculares, los efectos negativos podrían ser el resultado de una deficiente penetración del anticuerpo a través del parénquima cerebral (Springer & Loy, 1985).

Recientemente se reportó que la infusión crónica de anticuerpos específicos anti-NGF en el septum da lugar a un significativo

decremento en la actividad de colin-acetiltransferasa en el hipocampo. Esta estrategia sin embargo no permite establecer el papel del factor de crecimiento liberado por la región inervada y en particular el factor de origen cortical. A este respecto se ha demostrado recientemente que la eliminación masiva de neuronas corticales no parecen tener ningún impacto en la viabilidad de las células colinérgicas de la región basal (Minger & Davies, 1992).

Sin embargo, dado que el bloqueo cortical de NGF resulta en una deficiencia colinérgica local, es posible entonces que este factor sea necesario para el mantenimiento de una conectividad funcional mas que para la *supervivencia* de las neuronas colinérgicas del cerebro basal.

Es importante señalar que la naturaleza de nuestros experimentos no permite establecer si las neuronas colinérgicas de la region basal del cerebro anterior, son dependientes para su *supervivencia* de un factor neurotrófico liberado por el territorio de inervación.

Lo anterior se debe a que nuestros datos sólo muestran una inactivación funcional y una posible alteración estructural de las neuronas colinérgicas de la región basal como resultado del bloqueo endógeno del NGF, lo cual de ningun modo demuestra la muerte de estas células.

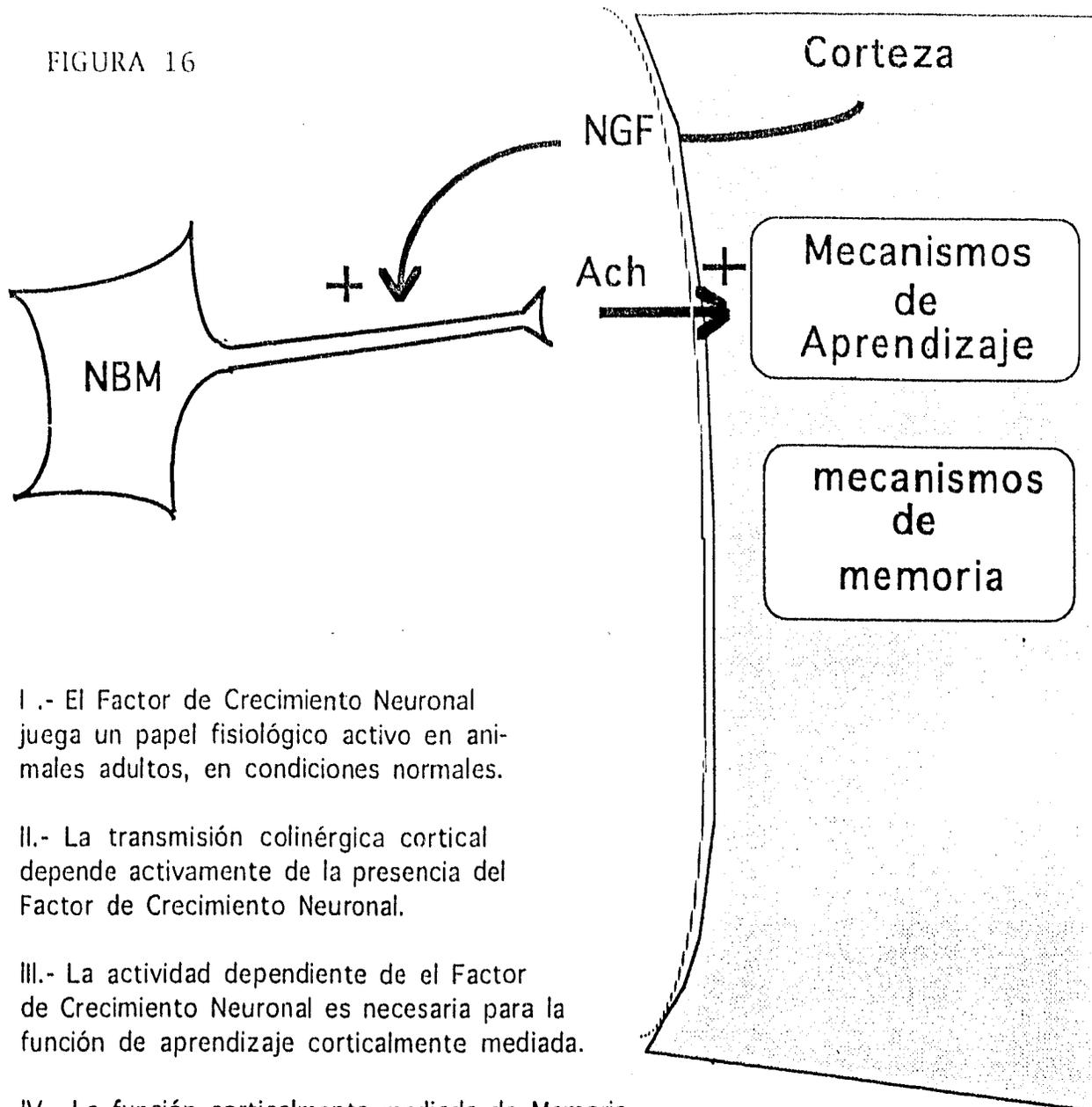
La conexión existente entre acetilcolina y las funciones de aprendizaje y memoria, así como la dependencia aquí demostrada entre la transmisión colinérgica y el factor de crecimiento neuronal en condiciones fisiológicas normales; proveen de la base suficiente para explicar los efectos conductuales aquí descritos... en lo que respecta al aprendizaje (Sinden et al., 1995; Etherington, Mittleman & Robbins, 1987; Everitt et al., 1987; Fitzgerald & Burton, 1983). Sin embargo, el papel del sistema colinérgico cortical en los mecanismos de retención o evocación es menos conocido.

Nuestros resultados sugieren un proceso independiente de la actividad colinérgica cortical involucrado en los mecanismos de memoria o evocación. A este respecto, recientemente se ha propuesto que la proyección basalocortical podría jugar un papel

importante únicamente en los estadios iniciales del proceso de aprendizaje (Durkin & Toumane, 1992). En favor de esta posibilidad se ha observado que la duración de la activación colinérgica cortical disminuye progresivamente a medida que aumenta el número de entrenamientos y el correspondiente aumento en el desempeño de la prueba en modelos de laberinto radial. La extensión lógica de este proceso implicaría la existencia de un momento en el que la intervención del sistema colinérgico podría no ser funcionalmente requerido durante el proceso de evocación (Durkin & Toumane, 1992; Durkin, 1994). Observaciones análogas se han reportado con experimentos de administración sistémica de escopolamina, en los cuales se ha observado un efecto decreciente dependiendo de si el tratamiento se lleva a cabo en las etapas iniciales o finales del programa de entrenamiento en el laberinto radial (Toumane & Durkin, 1993). Esta sensibilidad diferencial al bloqueador muscarínico sugiere que el sistema colinérgico deja de participar una vez que se ha aprendido la tarea en cuestión. Nuestros datos concuerdan con datos previos del laboratorio basados en experimentos de trasplantes de corteza fetal en animales previamente lesionados en la corteza inusular. En estos experimentos se observó que los trasplantes corticales inducían el recuerdo de condicionamientos previamente adquiridos lo cual entre otras cosas significaría que la traza de memoria (engrama) no se encuentra localizada en la región insular, lo cual a su vez implica que probablemente la corteza insular se halla involucrada en la salida de la información almacenada en alguna otra parte del cerebro. Por otra parte estos trasplantes inducen también la recuperación de la capacidad de aprender nuevos condicionamientos.

La adición de NGF a los tejidos fetales transplantados da lugar a una fuerte aceleración exclusivamente en la recuperación de la función de aprendizaje mediada por el trasplante, sin embargo la función de memoria no mostró alteración alguna ante la ausencia o presencia de NGF en el tejido transplantado. Experimentos con trasplantes heterotópicos por su parte muestran una clara correlación entre la recuperación colinérgica del trasplante y el restablecimiento de la

FIGURA 16



I.- El Factor de Crecimiento Neuronal juega un papel fisiológico activo en animales adultos, en condiciones normales.

II.- La transmisión colinérgica cortical depende activamente de la presencia del Factor de Crecimiento Neuronal.

III.- La actividad dependiente de el Factor de Crecimiento Neuronal es necesaria para la función de aprendizaje corticalmente mediada.

IV.- La función corticalmente mediada de Memoria es independiente de de las funciones sustentadas por el Factor de Crecimiento Neuronal.

función de aprendizaje, no siendo el caso para la recuperación de la memoria, que parece ocurrir independientemente de la función colinérgica del tránsplante (Ormsby & Bermúdez-Rattoni, 1995).

Nuestros datos parecen implicar directamente a la aferencia basalo cortical en esta regulación diferencial. La figura 16 muestra un modelo que intenta integrar la información obtenida.

En el modelo indicado se propone la participación del factor de crecimiento neuronal en el mantenimiento continuo de la actividad colinérgica cortical en el cerebro adulto. El diseño de los experimentos aquí descritos no nos permite determinar: 1) Si el efecto de bloqueo es o no reversible; 2) durante cuanto tiempo real las aferencias colinérgicas corticales experimentaron la carencia del factor 3) que tan estricta fué esta carencia y 4) si las células colinérgicas de la región basal mueren como resultado del bloqueo. La respuesta a estas interesantes interrogantes requiere sin duda alguna de subsecuentes experimentos. Sin embargo cabe señalar que cualquiera que sea el resultado de los mismos estos no afectan en modo alguno las conclusiones enumeradas en la figura 16.

En lo que respecta a las dos últimas conclusiones es importante hacer notar que el efecto de aparente disociación entre la adquisición de un condicionamiento (aprendizaje), y la retención y/o evocación de uno previamente adquirido, dado el bloqueo funcional de un factor trófico; crea la interesante posibilidad de estudiar por separado dos funciones que en general tienden a estudiarse indistintamente: aprendizaje y memoria.

APENDICE

SUJETOS:

Se utilizaron ratas Wistar macho con pesos entre 250 y 300grs. Fueron mantenidas en cajas individuales a 25 °C en un ciclo de luz oscuridad 12hs-12hs.

PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS GENERALES

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico 65mg/ kilo de peso.

Mediante técnicas estereotáxicas se practicaron dos trépanos en las coordenadas 0.2 mm en dirección caudal y +/-0.5 mm en dirección lateral con respecto a bregma, para la implantación de las cánulas. Dependiendo del experimento se utilizaron dos tipos de cánulas: guías cánula para microdiálisis (BAS) o cánulas de acero inoxidable (diámetro interno 0.33mm, diámetro externo 0.63mm). Las cánulas se fijaron al cráneo con cemento dental y reforzadas mediante tres tornillos de acero inoxidable en el cráneo.

PROCEDIMIENTOS DE INYECCION

Las inyecciones intracorticales se aplicaron durante tres días a los animales despiertos. Se utilizó anticuerpo monoclonal anti-NGF de raton (con especificidad por las fracciones 2.5S y 7S) disponible comercialmente (Boehringer Mannheim Germany; ED₅₀=0.1µg/ml). Un volumen total de 1 µl por hemisferio de PBS (vehículo) o anti-NGF (1µg/µl) fue inyectado utilizando un flujo de 0.07 µl/min. Alternativamente se utilizó un anticuerpo policlonal control (antiIgG de raton, 1 µg/µl) accesible también comercialmente. Las inyecciones fueron cuidadosamente ubicadas en la coordenada dorsoventral -5.5 mm y la localización de la punta del inyector fue identificada durante subsecuentes exámenes histológicos.

MICRODIALISIS

Cinco animales fueron implantados bilateralmente con guías intracerebrales para microdialisis de acuerdo con el procedimiento quirúrgico arriba descrito. Cada animal recibió tres inyecciones unilaterales de anticuerpo, el hemisferio contralateral recibió el mismo número de inyecciones de vehículo. Las inyecciones se hicieron a través de las guías mediante agujas dentales.

Adicionalmente cinco animales fueron implantados unilateralmente y conservados como controles intactos. Un tercer grupo fue igualmente operado y tratado con inyecciones equivalentes de anticuerpos policlonales anti-IgG de ratón. Dos semanas después del primer día de tratamiento inició el procedimiento de microdialisis. El procedimiento consiste en la inserción de la sonda de microdialisis (BAS CMA12, 0.5 mm de diámetro y 3 mm de longitud). La sonda fue continuamente perfundida con solución ringer suplementada con bromuro de neostigmina (5 mM) con un flujo de 2 ml /minuto mediante una bomba de microinfusión. Los primeros 60 minutos de muestra se descartaron y a partir de allí las muestras fueron colectadas cada 15 minutos (30ml por muestra) e inmediatamente congeladas para su posterior análisis.

ANALISIS DE LOS NIVELES DE ACETILCOLINA

El análisis de las muestras se llevo a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a detección electroquímica. Se utilizó una columna SepTiks de Microboro (BAS acetylcholine assay kit). Colina y acetilcolina fueron transformados en peróxido y betaina mediante un reactor enzimático acoplado a la columna de separación (BAS). El peróxido de hidrógeno se detectó electroquímicamente mediante un electrodo de platino (Ag/AgCl) a 500 mV. El límite de detección se definió como la cantidad de acetilcolina suficiente para producir un pico cuya amplitud fuera del doble del ruido basal: aproximadamente 0.2 pMol.

En este documento no se muestran los datos correspondientes a la colina

ANALISIS DE CONECTIVIDAD

De acuerdo con los procedimientos quirúrgicos y de inyección previamente descritos, cinco animales recibieron inyecciones unilaterales de anticuerpos antiNGF directamente en la corteza insular mientras que el hemisferio contralateral recibió el mismo número de inyecciones de vehículo.

El trazador fluorescente (0.3 ml, fluorogold 2.5%) fue aplicado bilateralmente en la corteza insular mediante una bomba de microinfusión (0.07ml/min). Cuatro días después los animales fueron perfundidos con paraformaldehído al 4% a través de la aorta ascendente. Se obtuvieron las secciones coronales de 40 μ m a lo largo de la región basal del cerebro anterior y el tálamo ventromedial. El sitio de la inyección fue verificado mediante la localización del tracto de inyección. La presencia de fluorogold en las neuronas marcadas retrogradamente se estudió con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. La determinación de la densidad relativa de neuronas marcadas en el cerebro basal y en el núcleo posteroventromedial del tálamo se llevó a cabo del siguiente modo: Se obtuvieron doce secciones a lo largo de cada estructura por cada cerebro. El espacio entre cada sección fue de aproximadamente 120 μ m. Se contaron las células marcadas dentro de un área predefinida de 0.125 mm² para el núcleo talámico (TPVM) y 0.5 mm² para el cerebro basal (NBM). El muestreo se hizo en las regiones de mayor densidad de neuronas marcadas. Por cada sección se hicieron cuatro determinaciones individuales. El mismo procedimiento se aplicó al hemisferio contralateral. Para cada cerebro y por cada estructura se determinó el número medio de neuronas marcadas por hemisferio.

PROCEDIMIENTOS CONDUCTUALES

CAS

Cinco días antes del primer entrenamiento de CAS los animales fueron habituados a beber agua una vez al día durante 15 minutos

(línea base). Al día siguiente (día cero en el protocolo mostrado en la figura 13) se presentó a los animales una solución 0.1 M NaCl como un estímulo novedoso en vez de agua. Treinta minutos después los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 0.15 M de LiCl (7.3ml/kg de peso). Cinco días después inició el procedimiento de bloqueo en el grupo experimental, el segundo grupo recibió el correspondiente tratamiento de vehículo y un tercer grupo permaneció intacto. Diez días después del tratamiento se privó nuevamente a los animales y se restableció la línea base de manera que al día 14 (a partir del tratamiento) el agua fue nuevamente substituida por la solución de NaCl y el consumo registrado como un índice de aversión. Dos días después se presentó un nuevo estímulo gustativo: 0.1% de sacarina. Media hora después los animales recibieron una inyección intraperitoneal de LiCl. La prueba de retención de aversión a la sacarina se verificó dos días después, registrándose el consumo como un índice de aversión.

Prevención Pasiva

Esta prueba se llevó a cabo inmediatamente después de las pruebas de CAS. El aparato consiste en una cámara con dos compartimentos uno iluminado y otro oscuro (ver fig 12), separados mediante una compuerta. En el suelo del compartimiento oscuro hay una placa metálica a través de la cual se aplica un choque eléctrico.

Se coloca al sujeto durante 20 segundos en el compartimiento claro. Al abrir la compuerta, debido a que las ratas son fotofóbicas, el animal normalmente se desplaza hacia el compartimiento oscuro, se cierra nuevamente la compuerta y se aplica un inevitable choque eléctrico de 1 mA durante 2 segundos, tras lo cual se libera nuevamente al animal. En la prueba, 24 horas después se vuelve a colocar al animal en el compartimiento claro, se abre la compuerta y se registra el tiempo que tarda el animal en entrar nuevamente a la zona oscura (latencia). Adicionalmente se registra el tiempo total que permanece el animal en uno de los compartimientos

(preferentemente el lado claro). La observación se hace durante un total de 600 segundos por animal.

REFERENCIAS

Abdulla, F. A., Abu-Bakra, M. A. J., Calamicini, M. R., Stephenson, J. D., & Sinden, J. D. (1995). Importance of forebrain cholinergic and GABAergic systems to the age-related deficits in water maze performance of rats. Neurobiology of Aging, *16*(1), 41-52.

Araujo, D. M., Chabot, J. G., & Quirion, R. (1990). Potential neurotrophic factors in the mammalian nervous system: functional significance in the developing and aging brain. International review of neurobiology, *32*, 141-174.

Arendt, T., Allen, Y., Marchbanks, R., Schugens, M. M., Sinden, J., Lantos, P. L., & Gray, J. A. (1989). Cholinergic system and memory in the rat: effects of chronic ethanol, embryonic basal forebrain transplants and excitotoxic lesions of cholinergic basal forebrain projections systems. Neuroscience, *33*, 435-462.

Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science, *217*, 408-417.

Benjamin, R. M., & Pfaffman, C. (1955). Cortical Localization of taste in the Albino Rat. Journal of Neurophysiology, *18*, 56-64.

Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collinson, I. B., & McGaugh, J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. Proceedings of the National Academy of Science USA, *88*, 5379-5382.

Bermúdez-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (1991). Insular Cortex and Amygdala Lesions Differentially Affect Acquisition on inhibitory

Avoidance and Conditioning Taste Aversion. Brain Research, 49, 165-170.

Bigl, V., Woolf, N. J., & Butcher, L. L. (1982). Cholinergic projection from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital, and cingulate cortices: A Combined Fluorescent tracer and Acetylcholinesterase analysis. Brain Research Bulletin, 8, 727-749.

Birling, M. C., & Price, J. (1995). Influence of growth factor on neuronal differentiation. Current opinion in cell biology, 7, 878-884.

Björklund, A., Hökfelt, T., & Kuhar, M. J. (1984). Classical transmitters and transmitter receptors in the CNS, part II. (Vol. 3). Amsterdam.

Bradshaw, R. A., Blundell, T. L., Lapatto, R., McDonald, N. Q., & Murray-Rust, J. (1993). Nerve growth factor revisited. Trends in Biochemistry sciences, 18, 48-52.

Bronzetti, E., Caporali, M. G., Felici, L., Niglio, T., Scotti-de-Carolis, A., & Amenta, F. (1993). Muscarinic cholinoreceptor subtypes in the rat frontoparietal cortex after ipsilateral lesions of the nucleus mesencephalicus profundus. Pharmacology, 46, 301-307.

Butcher, L. L., Oh, J. D., Woolf, N. J., Edwards, R. H., & Roghani, A. (1992). Organization of central cholinergic neurons revealed by combined in situ hybridization histochemistry and choline-O-acetyltransferase immunocytochemistry. Neurochemical International, 21(3), 429-445.

Crowly, C., Spencer, S. D., Nishimura, M. C., Chen, K. S., Pitts-Meek, S., Armanini, M. P., Ling, L. H., McMahon, S. B., Shelton, D. L., Levinson, A. D., & Phillips, H. S. (1994). Mice Lacking Nerve Growth Factor Display Perinatal Loss of Sensory and Sympathetic Neurons yet Develop Basal Forebrain Cholinergic Neurons. Cell, 76, 1001-1011.

Collerton, D. (1986). Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. Neuroscience, 19, 1-28.

Cuello, A. C., Maysinger, D., & Garofalo, L. (1992). Trophic factor effects on cholinergic innervation in the cerebral cortex of adult rat brain. Molecular Neurobiology, 6(4), 451-461.

Dunnett, S. B., & Fibiger, H. C. (1993). Role of forebrain cholinergic system in learning and memory: relevance to cognitive

deficits of ageing and alzheimer's dementia. progress in brain research, 98, 413-420.

Durkin, T. P. (1994). Spatial working memory over long retention intervals: dependence on sustained cholinergic activation in the septohippocampal or nucleus basalis magnocellularis- cortical pathways? Neuroscience, 62(3), 681-693.

Durkin, T. P., & Toumane, A. (1992). Septo-hippocampal and nBM-cortical cholinergic neurons exhibits differential time-courses of activation as a function of both type and duration of spatial memory testing in mice. Behavioural Brain Research, 50, 43-52.

Etherington, R. E., Mittleman, G., & Robbins, T. W. (1987). Comparative effects of nucleus basalis and fimbria-fornix lesions on delayed matching and alteration tests memory. Neurosci. Res. Commun., 22, 441-469.

Everitt, B. J., Robbins, T. W., Evenden, J. L., Marston, H. M., Jones, G. H., & Sirkia, T. E. (1987). The effects of excitotoxic lesions of the substantia innominata, ventral and dorsal globus pallidus on the acquisition and retention of a conditional visual discrimination: implication for cholinergic hypothesis of learning and memory. Neuroscience, 22, 441-469.

Everitt, B. J., Sirkia, T. E., Roberts, A. C., Jones, G. H., & Robbins, T. W. (1988). Distribution and some projections of cholinergic neurons in the brain of common marmoset, *Callithrix jacchus*. Journal of Comparative Neurology, 271, 533-338.

Fisher, W. (1994). Nerve growth factor reverses spatial memory impairments in aged rats. Neurochem. Int., 25, 47-52.

Fitzgerald, R. E., & Burton, M. J. (1983). Neophobia and conditioned taste aversion deficits in the rat produced by undercutting temporal cortex. Physiology and behavior, 30, 203-206.

Frotscher, M., & Naumann, T. (1992). Septohippocampal cholinergic neurons: Synaptic connections and survival following axotomy. Reviews in the Neuroscience, 3, 233-248.

Gage, F. H. (1990). NGF-dependent sprouting and regeneration in the hippocampus. Progress in Brain Research, 83, 357-370.

Green, J. R., Halpern, L. M., & Niel, S. V. (1970). Choline acetylase and acetylcholine esterase changes in cronic isolated cerebral cortex of the cat. Life Sci., 9, 481-488.

Hebb, C. O., Krnjević, K., & Silver, A. (1963). Effect of undercutting on the acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activity in the cat's cerebral cortex. Nature, 198, 692.

Hefti, F. (1986). Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. J. Neurosci., 6, 2155-2162.

Holzman, D. M., Kilbridge, J., Li, Y., Cunningham, E. T., Lenn, N. J., Clary, D. O., Reichardt, L. F., & Mobley, W. C. (1995). TrkA expression in the CNS: evidence for the existence of several novel NGF-responsive CNS neurons. The Journal of Neuroscience, 15(2), 1567-1576.

Imaizumi, K., Kudo, Y., Shiosaka, S., Lee, Y., Ikeda, M., Ohta, H., Matano, S., Shoji, M., Honjoh, T., & Thyama, M. (1991). Specific cholinergic destruction in basal magnocellular nucleus and impaired passive avoidance behavior of rodents. Brain Research, 551, 36-46.

Lindsay, R. M., Wiegand, S. J., Altar, C. A., & DiStefano, P. S. (1994). Neurotrophic factors: from molecule to man. Trends in Neuroscience, 17(5), 182-190.

López-García, J. C., Fernández-Ruiz, J., Escobar, M. L., Bermúdez-Rattoni, F., & Tapia, R. (1993). Effects of excitotoxic lesions of the Nucleus Basalis Magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 45, 147-152.

Mallet, P. E., Beninger, R. J., Flesher, S. N., Jhamandas, K., & Boegman, R. J. (1995). Nucleus Basalis lesions: Implication of basoamygdaloid cholinergic phatways in memory. Brain Res. Bull., 36(1), 51-56.

Mannes, L. M., Kastin, A. J., T.Weber, J., Banks, W. A., Beckman, B. S., & Sadina, J. E. (1994). The Neurotrophins and their receptors: Structure, function and Neuropathology. Neuroscience and Behavioral Reviews, 18(1), 143-159.

Minger, S. L., & Davies, P. (1992). Persistent innervation of the rat neocortex by basal forebrain cholinergic neurons despite the massive reduction of cortical target neurons. Experimental neurology, 117, 139-150.

Montalceini, R. L. (1987). The nerve growth factor 35 years later. Science, 237, 1154-1162.

Nabeshima, T. (1993). Behavioral aspects of cholinergic transmission: role of basal forebrain cholinergic system in learning and memory. Progress in brain research, 98, 405-411.

Nita, A., Murase, M., Furukawa, Y., Hayashi, K., Hasegawa, T., & Nabeshima, T. (1993). Memory impairment and neural dysfunction after continuous infusion of anti-nerve growth factor antibody into the septum in adult rats. neuroscience, 57(3), 495-499.

Ogawa, S., Nabeshima, T., Kameyama, T., & Hayashi, K. (1993). Effects of nerve growth factor (NGF) in rats with basal forebrain lesions. Japan. J. Pharmacol., 61, 141-144.

Ormsby, C., & Bermúdez-Rattoni, F. (1995). Induced remembrance of taste aversions by cortical implants. Society for Neuroscience Abstracts, 20, 1211.

Palmer, M. R., Eriksson, M., Henschen, A., Ebendal, T., & Olson, L. (1993). Nerve growth factor-induced excitation of selected neurons in the brain which is blocked by a low-affinity receptor antibody. Experimental Brain Research, 93(2), 226-230.

Perry, E. K., Tomlinson, B. E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P. H., & Perry, R. H. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. Br. Med. J., 2, 1457-1459.

Sangstok, G. J., Johnson, K. B., Jantzen, P. T., Meyer, E. M., Dunn, A. J., & Arendash, G. W. (1992). Nucleus basalis lesions in neonate rats induce a selective cortical cholinergic hypofunction and cognitive deficits during adulthood. Exp. Brain Res., 90(1), 163-174.

Sinden, J. D., Hodges, H., & Gray, J. A. (1995). Neural transplantation and recovery of cognitive function. Behavioral and brain science, 18, 10-35.

Springer, J. E., & Loy, R. (1985). Intrahippocampal injection of antiserum to nerve growth factor inhibit sympathohippocampal sprouting. Brain Research Bulletin, 15, 639-634.

Svendsen, C. N., Kew, J. N., Staley, K., & Sofroniew, M. V. (1994). Death of developing septal cholinergic neurons following NGF withdrawal in vitro: protection by protein synthesis inhibition. Journal of Neuroscience, 14(1), 75-87.

Toumane, A., & Durkin, T. P. (1993). Time Gradient for Post-test vulnerability to scopolamina-induced amnesia following the initial acquisition session of a spatial reference memory task in mice. Behavioral and Neural Biology, 60, 139-151.

Urschel, B. A., & Hulsebosch, C. E. (1992). Distribution and relative density of p75 nerve growth factor receptors in the brain as a function of age and treatment with antibodies to nerve growth factor. Brain Research, 591, 223-238.

Van-der-Zee, C., Rashid, K., Le, K., Moore, K. A., Stainsz, J., Diamond, J., Racine, R. J., & Fahnestock, M. (1995). Intraventricular Administration of Antibodies to Nerve Growth Factor Retards Kindling and blocks mossy fiber sprouting in adult rats. The journal of neuroscience, 15(7), 5316-5323.

Vantini, G., Schiavo, N., DiMartino, A., Polato, P., Triban, C., Callegaro, L., Toffano, G., & Leon, A. (1989). Evidence for a physiological role of nerve growth factor in the central nervous system of neonatal rats. Neuron, 3, 267-273.

Varon, S., Hagg, T., Vahlsing, L., & Manthorpe, M. (1989). Nerve growth factor in vivo actions on cholinergic neurons in the adult rat CNS. In L. Todd, L. Packer, & J. Jaz (Eds.), Cell function and disease, (pp. 235-248): Plenum Press.

Vazquez, M. E., & Ebendal, T. (1991). Messenger RNAs for trk and the low-affinity NGF receptor in rat basal forebrain. NeuroReport, 2, 593-596.

Wainer, B. H., & Mesulam, M. M. (1990). Ascending cholinergic pathways in the rat brain. In E. M. Steriade and D. Biesold (Ed.), Brain Cholinergic Systems, (pp. 65-119). Oxford: Oxford University Press.

Winkler, J., Shur, S. T., Gage, F. H., Thal, L. J., & Fisher, L. J. (1995). Essential role of neocortical acetylcholine in spatial learning. Nature, 357(8), 484-487.

Wolf, N. J. (1991). Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. Progress in Neurobiology, 37, 475-524.