



Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y
de Posgrado del Colegio de Ciencias y
Humanidades

Sede: Instituto de Fisiología Celular

El Papel Colinérgico en la Recuperación del Aprendizaje del Condicionamiento Aversivo a los Sabores Mediada por Transplantes Corticales

Tesis para obtener el Título de

Maestría en Investigación Biomédica Básica

Presenta:

María Isabel Miranda Saucedo

Director de tesis: Dr. Federico Bermúdez Rattóni

Ciudad Universitaria 1996



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

0 3062

**El Papel Colinérgico
en la Recuperación del Aprendizaje
del Condicionamiento Aversivo a los Sabores
Mediada por
Transplantes Corticales**

María Isabel Miranda Saucedo

Tesis para obtener el Título de
Maestría en Investigación Biomédica Básica

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Hernando, María Isabel,
Miguel, Marcela y Shaun.



Un agradecimiento muy especial al Dr. Federico Bermúdez Ratttonni por su apoyo constante y al Dr. Ricardo Tapia Iburgüengoytia por sus acertadas observaciones durante el desarrollo de mi Maestría.

Gracias a los sinodales de esta tesis: Dra. Elvira Galarraga, Dr. Gonzalo Martínez de la escalera y Dr. Luis Vaca; así como a la Dra. Ana María López Colomé por su valiosa colaboración.

Gracias a Heinz Dieterich por la introducción temprana al método científico; a Patricia Salazar por el intento; a Oreste Carbajal por su ayuda técnica, a Alberto Morales, Lourdes Massieu, Yolanda Díaz de Castro y Tere Montiel por los préstamos y los consejos; Gracias a Adriana Hernández por sus correcciones en la redacción y ortografía; así como a Miguel Miranda por regalarme un poquito de su arte en el diseño gráfico.

Esta tesis fué apoyada por medio de los proyectos IN20-201983
DGAPA-UNAM y N9207-1554 del CONACyT

Indice



Abreviaturas	1.
RESUMEN	2.
INTRODUCCION	3.
MARCO TEORICO	5.
1. Papel del Sistema Colinérgico en el Aprendizaje y la Memoria	5.
1.1. Anatomía del Sistema Colinérgico del Cerebro Anterior Basal	10.
2. Transplantes cerebrales y recuperación funcional	14.
2.1. Estudios del sistema de proyecciones colinérgicas del cerebro anterior basal: Transplantes colinérgicos	18.
3. El Condicionamiento Aversivo a los Sabores	21.
3.1. Transplantes corticales y recuperación del condicionamiento aversivo a los sabores	25.
4. Aminoácidos excitadores: Participación en aprendizaje y memoria.	28.
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31.
OBJETIVOS	33.
MATERIALES Y METODOS	34.
RESULTADOS	40.
Recovery of taste aversion learning induced by fetal neocortex grafts: Correlation with <i>In Vivo extracellular acetylcholine</i>	
CONCLUSIONES GENERALES	41.
REFERENCIAS	49.

Abreviaturas



ACh, acetilcolina
AMPA, a-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionato
AP, área postrema
AP5, ácido 2-amino-5-phosphonovalérico
amyg, amígdala
bas, núcleo basalis
CAB, cerebro anterior basal
CAS, condicionamiento aversivo a los sabores
ChAT, colina acetiltransferasa
CI, corteza insular
CPP, 3-(RS)-(2-carboxypiperazine-4-yl) propyl-1-phosphonato
CrN, núcleo del nervio craneal dorsal
DNQX, 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
DR, núcleo raquídeo dorsal
EC, estímulo condicionado
EI, estímulo incondicionado
GABA, ácido g-aminobutírico
HPLC, cromatografía de líquidos de alta resolución
ICj, islotes de Calleja
KA, kainato
L-Glu, L-Glutamato
LR, núcleo lateral reticular
LTD, depresión a largo plazo
LTP, potenciación a largo plazo
MCPG, L-methyl-4-carboxyphenyl glycina
NBM, núcleo basalis magnocelularis
ms, núcleo septal medial
NGF, factor de crecimiento neuronal
NMDA, N-methyl-D-aspartato
NPB, parabraqueal del puente
NTS, núcleo del tracto solitario
NVT, núcleo ventromedial del tálamo
OC, corteza occipital
olfact, tracto olfatorio
pir, corteza piriforme
PN, núcleo pontino
poma, campo preóptico magnocelular
Rt, formación reticular
SDS, sodio dodecil sulfato
si, sustancia innominata
SN, sustancia nigra
SNC, sistema nervioso central
Sp5, núcleo espinal del nervio craneal 5
t-ACPD, (1S,3R)-1-aminociclopentano-1,3- dicarboxilato
td, banda diagonal
Ve, núcleo profundo vestibular

Resumen



El trabajo realizado en la presente tesis tuvo como propósito estudiar algunos aspectos del aprendizaje, enfocándose en los mecanismos que permiten a los trasplantes corticales promover la recuperación del aprendizaje perdido, por una lesión cortical, de un paradigma conductual denominado condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). Los experimentos se realizaron en ratas previamente lesionadas en la corteza insular (CI), las cuales fueron transplantadas con tejido homotópico (CI) o heterotópico (corteza occipital) de fetos de 16 días de gestación. Las pruebas conductuales realizadas después de la colocación del trasplante, comprobaron los resultados ya publicados con anterioridad, de que la recuperación conductual se logra sólo con los trasplantes homotópicos y presenta un curso temporal: se observó recuperación significativa hasta los 45 días postrasplante. Las mediciones de acetilcolina (ACh) extracelular *in vivo* en los trasplantes colocados en la CI, mostraron que el grupo de ratas con trasplantes homotópicos analizados 45 días postrasplante, presentaron niveles similares de ACh antes y después de la estimulación con KCl; sin embargo, el grupo de animales analizados 15 días postrasplante, sólo presentó una mejoría parcial en los niveles extracelulares después de la estimulación con KCl. Para el caso de los animales con trasplantes heterotópicos, el análisis reveló diferencias significativas en los niveles de ACh, después de la estimulación.

Por otra parte, se estudió la participación de los receptores al L-glutamato, en la promoción de la recuperación del CAS a través de trasplantes corticales; el tejido lesionado presentó una unión específica para L-glutamato significativamente menor que el grupo control para todas las drogas probadas. En cambio el tejido homotópico de 45 días postrasplante logró elevar los niveles de unión a comparación del tejido lesionado sin llegar a comportarse como el control. El tejido heterotópico no presentó diferencias significativas con el tejido control, a pesar de no haber logrado la promoción de la función conductual perdida. Estos resultados sugieren que la ACh, a comparación de otros neurotransmisores (i.e. glutamato), está específicamente involucrada en los procesos de recuperación conductual inducidos por los trasplantes corticales homotópicos y parece jugar un papel relevante en el aprendizaje del condicionamiento aversivo.

Introducción



Uno de los temas más apasionantes dentro del estudio de las neurociencias, es la búsqueda del sustrato de los procesos cognoscitivos, los cuales involucran una serie compleja de sucesos encargados de procesar la información en el sistema nervioso central (SNC), desde el procesamiento sensorial hasta la formación de asociaciones con experiencias previas. De esta forma, algunas de las interrogantes que han existido desde tiempos inmemorables abarcan fenómenos tan cotidianos como el aprender y el recordar cada uno de las acciones que conforman nuestra conducta. El conocimiento de estos procesos involucra la investigación de las estructuras nerviosas participantes y de los mecanismos celulares y moleculares subyacentes. Actualmente, se han logrado grandes avances en el estudio de los sucesos bioquímicos que regulan el almacenaje y la salida de la información en el SNC, incluyendo el estudio de las áreas directamente relacionadas y su interacción en los diferentes eventos del aprendizaje y la memoria.

La forma más importante mediante la cual el medio ambiente altera la conducta en los animales es el aprendizaje y constituye el proceso de adquisición del conocimiento. La memoria es la retención o almacenaje de este conocimiento. La investigación de ambos procesos facilita la capacidad de entender el sustrato fisiológico que permite aprender y recordar determinada información en el cerebro.

Por otra parte, el estudio del aprendizaje es esencial para comprender tanto la conducta normal como la anormal. Se cree que el aprendizaje podría contribuir a la génesis de ciertas enfermedades mentales y somáticas, de tal forma que los logros en los estudios enfocados a la caracterización de los principios que gobiernan el aprendizaje, podrían ser aplicados en los pacientes que sufren de dichas enfermedades. Actualmente, las técnicas conductuales basadas en los procesos de aprendizaje son ampliamente utilizadas en la investigación neurobiológica y clínica para evaluar los efectos de lesiones cerebrales, así como una variedad de manipulaciones farmacológicas¹¹².

El trabajo realizado para esta tesis tuvo como propósito estudiar algunos aspectos del aprendizaje, enfocándose en los mecanismos que permiten a los trasplantes corticales promover la recuperación del aprendizaje, perdido por una lesión cortical, de un paradigma conductual denominado condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). Este condicionamiento se caracteriza por la asociación de un sabor con un malestar gástrico, lo que provoca la aversión

posterior a dicho sabor. Las estructuras nerviosas involucradas durante el CAS están bien definidas y localizadas; esto ha permitido estudiar su relación con diferentes metodologías.

En este trabajo se decidió utilizar la técnica de microdialisis para cuantificar, a diferentes tiempos, los niveles extracelulares del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en el tejido transplantado y poder establecer su participación en la promoción de la recuperación conductual. Los resultados reseñados en la literatura y los que se presentan en esta tesis, tienden a confirmar, entre otros hallazgos, la teoría de la participación colinérgica en la recuperación de ciertos tipos de aprendizaje mediada por transplantes.

El marco teórico de este trabajo abarca en primer término, los antecedentes que sustentan la relación del sistema colinérgico con los procesos cognoscitivos, en particular con el aprendizaje y la memoria. En segundo lugar, se desarrollan los aspectos básicos sobre la teoría de transplantes y los resultados de los trabajos que han utilizado esta metodología como estrategia en el estudio de la participación colinérgica en determinados paradigmas conductuales. Subsecuentemente, se desarrolla la información pertinente al paradigma del CAS y su relación con el sistema de neurotransmisión colinérgico, así como la mediación que este sistema pudiera tener en la recuperación del aprendizaje del CAS mediada por transplantes cerebrales.

Otro objetivo fue estudiar la participación de los receptores a aminoácidos excitadores, particularmente el L-glutamato, en la promoción de la recuperación del CAS a través de transplantes corticales; esto debido a la importancia que se le ha otorgado a este neurotransmisor en fenómenos plásticos de largo plazo, altamente relacionados con el aprendizaje y la memoria. La justificación a este respecto se encuentra en el capítulo cuarto.

Los resultados obtenidos a partir de los objetivos planteados se exponen en dos secciones: la primera parte incluye la descripción de la metodología utilizada para los experimentos del manuscrito del trabajo que será enviado a publicación internacional y que incluye los resultados de la medición extracelular de los niveles de ACh y el análisis de desplazamiento de ligandos para el receptor de L-glutamato, en los transplantes corticales.

Por último en las conclusiones generales se tratará de unificar y proponer, a partir de dichos resultados, algunos de los mecanismos que pudieran estar participando en la promoción del aprendizaje del condicionamiento aversivo, tratando de enfocar la discusión hacia las perspectivas más urgentes que podrían ayudar a comprender mejor el interesante fenómeno de la recuperación funcional mediada por transplantes cerebrales.

Marco Teórico



1

Papel del Sistema Colinérgico en el Aprendizaje y la Memoria

La ACh fue el primer compuesto en el sistema nervioso central de mamíferos con los requisitos farmacológicos necesarios para ser considerado un neurotransmisor⁹⁰. Desde entonces se han utilizado diversas técnicas para estudiar su distribución y función en el cerebro. Los trabajos pioneros realizados por Deutsch en la década de los setentas iniciaron una línea de investigación enfocada en la participación de la ACh como parte del sustrato fisiológico de la memoria. Los resultados obtenidos sugirieron que el establecimiento de la memoria dependía de niveles óptimos de ACh en las sinapsis involucradas en el proceso: cuando los niveles del neurotransmisor se encontraron bajos los inhibidores de la colinesterasa - la enzima de degradación de la ACh - mejoraron la memoria (p.e. en el caso del aprendizaje de una nueva conducta o durante el olvido); así mismo, cuando los niveles fueron altos, un exceso del neurotransmisor produjo el deterioro de la memoria ya adquirida (i.e. en el caso de una conducta bien aprendida)²⁸.

Posteriormente, otras investigaciones relacionadas utilizaron como metodología central el suministro de drogas anticolinérgicas (i.e. escopolamina, atropina, etc.) en el SNC, las cuales produjeron amnesia en diferentes clases de paradigmas conductuales; en contraste, cuando se utilizó agonistas colinérgicos (oxotremorina o inhibidores reversibles de la colinesterasa, como la fisostigmina), se logró facilitar las funciones de aprendizaje y en ocasiones revertir deficiencias de memoria experimentalmente inducidas⁷⁰.

Esta serie de evidencias promovió la amplia aceptación de que el sistema colinérgico juega un papel crucial en el aprendizaje y la memoria^{35, 50, 58, 84, 91, 92}. De la misma forma, se ha comprobado que la reducción de la actividad colinérgica cortical, relacionada con el daño de las neuronas del sistema colinérgico del cerebro anterior basal (CAB), en particular el núcleo basalis de Meynert, tiene un papel preponderante en el deterioro cognoscitivo asociado con la demencia⁷⁴.

Los estudios de cerebros humanos han correlacionado fuertemente la disminución de la actividad colinérgica con enfermedades que provocan pérdidas de la memoria. Un ejemplo

5.

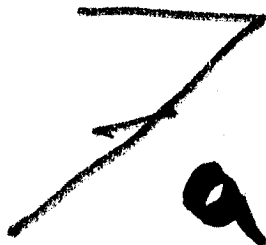
significativo es la enfermedad de Alzheimer, donde los cerebros de los pacientes afectados por este mal presentan una clara disminución en la inmunohistología de la enzima de síntesis de la ACh, la colina acetiltransferasa (ChAT) en neocorteza, formación hipocampal y amígdala, las cuales son regiones inervadas por las proyecciones del sistema colinérgico del CAB; en concordancia, también se ha observado una pérdida de cuerpos celulares en tres de los principales núcleos de este sistema: el núcleo basalis de Meynert (o en la rata: núcleo basalis magno celularis (NBM)) que proyecta principalmente a la neocorteza; así como en el área septal medial y el núcleo de la banda diagonal de Broca, que proyectan a la formación hipocampal⁷⁴.

Además de las evidencias *post mortem* en los cerebros de pacientes con Alzheimer, también se ha observado una alta correlación con la pérdida de marcadores colinérgicos en otro tipo de condiciones patológicas, que además de tener sus propias características de disminución en otros sistemas de neurotransmisión, presentan en algunas de sus etapas pérdidas de funciones cognitivas; tal es el caso de la demencia, la psicosis de Korsakoff, la demencia pugilística y la enfermedad de Parkinson³.

Estas observaciones originaron la hipótesis de que *el daño de las aferencias del sistema colinérgico del CAB juega un papel de suma importancia en las deficiencias cognitivas humanas dentro de una serie de enfermedades neurodegenerativas*⁹⁰. La posibilidad de restauración de la transmisión colinérgica del CAB podría entonces mejorar algunas características dañadas del aprendizaje y la memoria, ejemplificadas de manera sobresaliente en la enfermedad de Alzheimer^{9,74}. Sin embargo, a pesar de los indicios obtenidos en investigaciones realizadas con precursores de ACh que han logrado incrementar los niveles de este neurotransmisor en animales de laboratorio, aún no han mostrado ninguna mejoría en los ensayos con enfermos de Alzheimer.

Junto con la pérdida colinérgica, se sabe que existen deficiencias de otros neurotransmisores en pacientes de Alzheimer. Por ejemplo, se han observado deficiencias corticales de norepinefrina y de serotonina como consecuencia de la pérdida celular en el locus ceruleus y en el núcleo de Rafé^{2,74}. De tal forma, queda por responder el porqué mueren ciertas neuronas en la enfermedad de Alzheimer. Una de las varias especulaciones al respecto, sobre la etiología de esta enfermedad, es la de que las neuronas degeneran debido a la disminución específica de factores de crecimiento o las neuronas se vuelven menos eficaces para responder a los factores de crecimiento. Uno de los factores más conocidos, el factor de crecimiento neuronal (NGF por sus siglas en inglés), puede unirse a neuronas del CAB y ayudar a prevenir su degradación bajo ciertas condiciones experimentales. Estas ideas han permitido sugerir que la degeneración neuronal en la enfermedad de Alzheimer podría prevenirse o aminorarse si se aplican apropiadamente factores tróficos.

FALTA PAGINA

 No.
9

Anatomía del Sistema Colinérgico del Cerebro Anterior Basal

El neurotransmisor ACh, al igual que las aminas biogénicas, no es un intermediario de rutas bioquímicas generales, y se produce sólo en ciertas neuronas de áreas cerebrales relativamente específicas. En contraste, los aminoácidos caracterizados como neurotransmisores (p.e. glutamato, aspartato, glicina) son constituyentes celulares *universales* y se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC sin hallarse en núcleos celulares específicos.

La disposición anatómica de los núcleos colinérgicos en el SNC de mamíferos sugiere una coordinada actividad moduladora (figura 1). En el cerebro de la rata, las neuronas colinérgicas forman columnas continuas de células que se extienden rostralmente desde el corpus striatum (incluyendo el nucleus accumbens, tubérculo olfatorio, islotes de Calleja, y el caudado putamen) a través del CAB (incluyendo el núcleo septal medial, los brazos vertical y horizontal del núcleo de la banda diagonal de Broca, el núcleo basalis, la sustancia innominata, y el núcleo del ansa reticularis). Caudalmente, estas columnas se extienden a través de las regiones basales del diencéfalo (incluyendo el hipotálamo posterior y las neuronas motoras de los nervios craneales III y IV) dentro del núcleo pedunculopontino y laterodorsal tegmental del cerebro medio¹⁰⁵.

Desde esta visión global, todo el sistema colinérgico parece formar un complejo unificado de subsistemas adyacentes¹⁰⁵. Esta naturaleza contigua de los cuerpos celulares colinérgicos a través del SNC de mamíferos, se manifiesta en la confluencia y la sobreposición de cada *plexus* dendrítico del subsistema. Las ramificaciones dendríticas de las neuronas ChAT-positivas se entremezclan, no sólo dentro, sino también entre los límites citoarquitectónicos tradicionales.

En la corteza cerebral, las principales vías de proyección del CAB pueden dividirse en tres ramas⁹⁰. La primera, la rama rostral, se origina en el núcleo septal medial y el brazo vertical de la banda diagonal de Broca, sus fibras ChAT-positivas en el cingulum, viajan caudalmente a través del fornix para inervar la formación hipocampal, así como las cortezas entorrinal y peririnal. Las células blanco de las neuronas colinérgicas en la formación hipocampal han sido quizás, las más estudiadas en el cerebro⁴⁰. La segunda rama o vía media, inicia de una parte del brazo vertical, y del brazo horizontal de la banda diagonal, así como del área preóptica magnocelularis, inervando las cortezas cingulada

y retrosplenial además de ciertas estructuras allocorticales, particularmente el bulbo olfatorio, la amígdala, así como las cortezas insular* y piriforme. Por último, la tercera rama del sistema colinérgico del CAB comprende una mayor extensión de proyecciones que inervan principal y enteramente a la neocorteza.

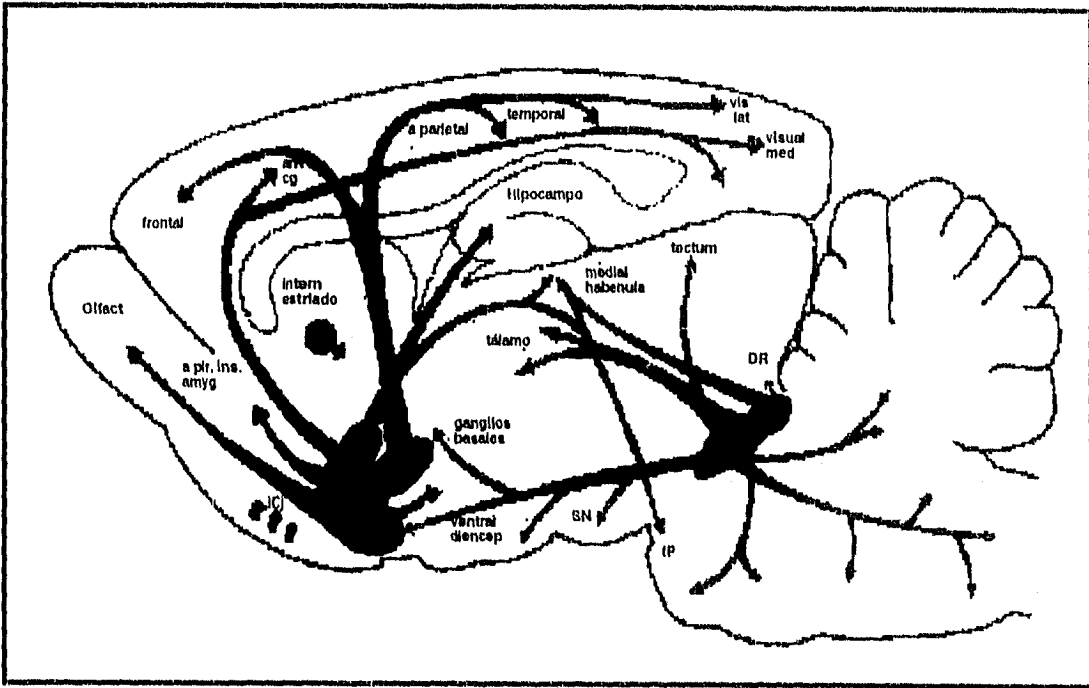


Figura 1: Representación esquemática del plano horizontal de los principales sistemas colinérgicos en el cerebro de mamíferos (modificado de Woolf, 1991¹⁰⁵). Como se observa en la figura, las neuronas colinérgicas centrales muestran dos esquemas organizacionales fundamentales: (a) circuito de células locales, ejemplificadas por las interneuronas del núcleo caudado-putamen, nucleus accumbens, 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 prebúlfico magnocelular (poma), y el núcleo basalis (bas) y proyecciones a todo el telencéfalo no estriado y (b) el complejo colinérgico pontomesencefalo-tegmental compuesto por células inmunoreactivas a ChAT en el núcleo tegmental pedunculopontino (tpp) y laterodorsal (ldt), proyectando ascendentemente al tálamo y a otros sitios diencefálicos y descendientemente a la formación reticular (RI) pontina y medular, núcleo profundo cerebelar (DeC) y vestibular (Ve) y núcleo del nervio craneal. Otras abreviaciones: amígdala (amyg), corteza anterior cingulada (ant cg), núcleo del nervio craneal dorsal (CrN), diencefalo (diencep), núcleo rasé dorsal (DR), corteza frontal (frontal), corteza insular (ins), núcleo lateral reticular (LR), olfatorio (olfact), corteza piriforme (pir), núcleo pontino (PN), corteza parietal (parietal), substancia nigra (SN), núcleo espinal del nervio craneal 5 (Sp5), corteza temporal (temporal), corteza visual lateral (vis lat), corteza visual media (visual med).

* Al contrario de estas investigaciones, en nuestro laboratorio recientemente encontramos, por medio del trazador retrógrado Fluorogold, que la ubicación de las aferencias provenientes del CAB en la corteza insular, se originan principalmente del NBM, incluyendo a la substancia innominata y al hipotálamo lateral (resultados no publicados).

Las aferencias del CAB en el cerebro de rata son la fuente principal de ACh en la neocorteza (90-95%)¹. Sin embargo, aún queda por esclarecer la existencia de neuronas colinérgicas en la corteza, así como cuáles células son las responsables de la liberación de ACh. Algunas investigaciones han considerado a las neuronas polares y ocasionalmente las multipolares, distribuidas entre las capas corticales II-IV, como las responsables del suministro colinérgico intrínseco de la corteza, pues son reactivas a anticuerpos monoclonales contra ChAT⁵². No obstante, otros trabajos que utilizaron hibridación *in situ* del mRNA de ChAT, combinada con técnicas inmunocitoquímicas para localizar neuronas putativas colinérgicas en el SNC de ratas, no encontraron ninguna señal de hibridación en la corteza, en el hipocampo ni en estructuras sensoriales primarias de representación olfativa, a pesar de que algunas células sí presentaron inmunoreactividad para ChAT¹⁹.

La rama del CAB que inerva a la neocorteza de la rata se origina en los somas de neuronas ChAT-positivas del núcleo basalis, substancia innominata y del núcleo del ansa lenticularis (denominados colectivamente NBM); la topografía de las proyecciones del NBM en su mayor parte presentan un gradiente rostrocaudal. En el cerebro de las ratas, las neuronas se encuentran más densamente empacadas dentro del NBM que las neuronas colinérgicas de monos del viejo y nuevo mundo⁶⁷, así como de humanos⁸⁶. De manera similar a la formación hipocampal, la innervación ChAT-positiva a la corteza presenta una organización laminar en apariencia, posee terminales densas y tinción de fibras en las capas II, III y V, las cuales también presentan una alta densidad de inmunoreactividad a receptores colinérgicos, ya sean muscarínicos o nicotínicos¹⁰⁰.

Tanto el nivel anatómico grueso (la distribución dispersa de las innervaciones a varias regiones del cerebro por grupos de células colinérgicas), como el nivel de estructura fina (la innervación de diferentes tipos celulares y de blancos sinápticos), parecen indicar que el sistema colinérgico del CAB presenta una organización difusa altamente diferenciada que depende de la especie; esta organización no puede clasificarse desde el punto de vista topográfico punto a punto, como se observa claramente en las regiones de los blancos sinápticos de la formación hipocampal⁹⁰.

En conclusión y retomando la información que sugiere que el neurotransmisor ACh está altamente relacionado con el mantenimiento normal de las funciones cognitivas, queda aún por esclarecer si las pérdidas observadas en el aprendizaje y/o la memoria de determinados

paradigmas, se deben a alteraciones sensoriomotoras o disfunciones en la atención, quizás provocadas por la interrupción de la actividad moduladora del sistema colinérgico del CAB. De la misma forma, no deberá olvidarse la posibilidad de que las deficiencias cognitivas sean el resultado de la pérdida de otras inervaciones colinérgicas del CAB que no se dirigen directamente a la corteza, como el caso de la amígdala y el tálamo⁹.

La descripción de los diferentes sucesos que son regulados por el sistema colinérgico podrán dar las pautas para encontrar una manera efectiva de curar enfermedades del SNC, así como para comprender los mecanismos involucrados en los procesos cognoscitivos. En las últimas décadas se han empleado diversas metodologías para estudiar al sistema colinérgico; una de ellas ha sido la implantación de órganos o tejidos sanos que logren aminorar las pérdidas ocasionadas por ciertas enfermedades. Los resultados obtenidos hasta ahora sobre la recuperación funcional promovida por trasplantes son, en muchos casos, contradictorios y polémicos. A pesar de esto, es reconocido que la técnica de trasplantes de tejido nervioso ha logrado aportar una serie de evidencias sobre el funcionamiento de las áreas involucradas, por lo que sigue considerándose una herramienta de gran utilidad en la investigación básica del SNC. En los próximos capítulos abarcaré con mayor detalle la teoría de trasplantes.

Transplantes cerebrales y recuperación funcional

Las primeras investigaciones sobre transplantes en el sistema nervioso datan de 1890, y fueron realizadas por Thompson en la corteza cerebral de perros y gatos. En 1917 E. Dunn fue el primero en tener éxito al transplantar corteza cerebral de una rata neonatal a la corteza neonatal de otra. Posteriormente, Le Gross Clark en 1940 realizó injertos de corteza fetal en neonatos de conejos y ratas. En la década de los setenta, Björklund y su grupo en Suecia, así como Das y su equipo en EUA, reportaron los primeros transplantes exitosos de tejido fetal en diversas áreas del SNC de ratas y conejos adultos. En la década siguiente Olson y colaboradores se aventuraron a realizar los primeros transplantes de médula adrenal en cerebro humano¹⁴.

Actualmente se encuentra en la literatura científica una gran cantidad de investigaciones con transplantes en diferentes regiones cerebrales y en diferentes especies animales. Los logros obtenidos hasta ahora sobre la recuperación funcional mediada por los transplantes son en la mayoría controversiales. Sin embargo, no cabe duda que la información obtenida a través de la metodología de transplantes está ayudando a esclarecer o al menos, describir aspectos poco conocidos de la plasticidad del SNC.

Según Stenevi, Björklund y Svengaard⁹⁷, existen ciertos preceptos que deben considerarse para que el transplante induzca recuperación funcional:

- El tejido del SNC sólo es viable como injerto cuando el donador se encuentre en desarrollo embrionario.
- Existe un tiempo límite de desarrollo para obtener el tejido a ser transplantado (variable para cada tipo neuronal).
- La selección del sitio del transplante en el huésped; el lugar para colocarlo de preferencia debe estar altamente vascularizado y proveer soporte para su rápida incorporación con vasos y con la circulación del líquido cerebroespinal del huésped. Por ejemplo, existen cavidades o espacios naturales

como son los ventrículos, o pueden crearse espacios a través de lesiones que después de revascularizarse acepten adecuadamente al injerto.

■ Las células neuroepiteliales de las diversas regiones que han sido estudiadas continúan su proliferación, produciendo neuronas morfológicamente normales después de transplantarse; aquellas células ya diferenciadas, al transplantarse son capaces de sobrevivir y mantener su arreglo citoarquitectónico original.

■ El cerebro huésped acepta el tejido extraño (siempre y cuando el donador sea de la misma especie), a diferencia de lo que ocurre con trasplantes de otros órganos*.

Los mecanismos por los cuales los trasplantes pueden promover la recuperación funcional son variados y en la mayoría de los casos, pueden presentarse en forma conjunta. Los efectos posteriores causados por el injerto, dependen en gran medida del sitio y del tipo de procedimiento que se haya utilizado. Por ejemplo, Gibson y Krieger⁴⁷ realizaron trasplantes intraventriculares del área preóptica, que contenían altas cantidades de hormona liberadora de gonadotropinas, que lograron reestablecer las funciones gonadales de ratones que tenían deficiencias genéticas en la producción de esta hormona. La recuperación obtenida bajo esta metodología sugiere que el trasplante libera factores humorales (neurotransmisores u hormonas) al tejido huésped, recuperando su función a través de las neuronas sensibles a la sustancia humoral presentes en el injerto. La misma teoría puede aplicarse para los resultados³³ obtenidos con trasplantes dopaminérgicos de sustancia nigra o de médula adrenal, que se aplicaron en ratas lesionadas en el sistema nigro-estriatal, y que promovieron la recuperación del control motor por medio de la liberación de dopamina. Estos datos sugieren que los neurotransmisores liberados por el trasplante tienen potencialmente la capacidad de regular y/o

* El SNC ha sido considerado como uno de los sitios inmunológicos privilegiados (junto con la cámara anterior y la córnea del ojo, la próstata y los testículos, así como el espacio de la médula ósea, entre otros); El término *privilegiado* implica un beneficio, una ventaja generada por las condiciones especiales del cerebro que logran mantenerlo relativamente aislado del sistema inmune, lo que permite que tejido extraño transplantado a esta región sobreviva más tiempo que el mismo tejido transplantado a otros sitios no privilegiados. Al parecer el SNC consta de un sistema linfático poco desarrollado y de la presencia de la barrera hematoencefálica. De la misma forma, la ausencia o la baja expresión de los antígenos codificados por el complejo principal de histocompatibilidad (CPH), incluyendo los antígenos clase I, en las células normales del SNC puede ser de suma importancia para el otorgamiento del *estado privilegiado* observado en trasplantes de SNC a SNC, que no se observa en trasplantes de piel o de tejidos endócrinos a SNC, los cuales sí expresan los antígenos clase I de CPH⁷².

modificar la estructura sináptica en el tejido adulto, de igual forma, controlan los procesos de neurodegeneración provocados por la manipulación previa al trasplante⁴⁸. Así mismo, los factores tróficos provenientes del tejido fetal transplantado pueden promover directamente la recuperación funcional de áreas lesionadas, ayudando a la supervivencia y crecimiento de las células del trasplante, así como al desarrollo de neuritas y su posible diferenciación, en caso de provenir del sistema periférico^{23, 24}.

A pesar del gran número de evidencias que señalan que los trasplantes fetales pueden reestablecer las funciones neurales y conductuales sin la reconstrucción específica de los circuitos neuronales, aún permanece la idea de que la reconectividad de las vías, debe ser el medio más efectivo para promover la recuperación⁹⁰. Cuando se analiza con detalle las investigaciones de reconectividad en su mayoría, indican que dichas conexiones se encuentran esparcidas y limitadas a las áreas de contacto entre el trasplante y el huésped^{11, 12, 53}. Además, tanto los trasplantes realizados con suspensión de neuronas o con bloque sólido de tejido presentan neuronas individualmente sanas pero, en general, la citoarquitectura del trasplante no es normal^{69, 96}. Sin embargo, existen algunos estudios anatómicos, raramente con un seguimiento conductual, que demuestran algún tipo de reestablecimiento punto a punto de los circuitos y de la morfología sináptica^{10, 13, 102}, con una completa integración del trasplante y el tejido el huésped. De la misma forma, también se han encontrado proyecciones del tejido huésped hacia el trasplante y viceversa^{45, 46, 51, 53, 61, 66, 77, 98}.

En conclusión, la recuperación mediada por trasplantes neurales en el cerebro dañado se debe probablemente a un conjunto de procesos que incluyen, por ejemplo, el reemplazo de neurotransmisores, la liberación de sustancias tróficas, y sólo en pocos casos, la reconectividad de los circuitos neurales entre el tejido transplantado y el tejido huésped. De la misma forma, deberán tomarse en cuenta las investigaciones que han documentado efectos nocivos producidos por los trasplantes; algunos trabajos han mostrado conexiones aberrantes, crecimiento excesivo del trasplante y/o liberación descontrolada de sustancias tróficas, los cuales se correlacionaron con un aumento en las deficiencias conductuales observadas previamente a la colocación del trasplante⁹⁶.

De esta manera, el estado actual de la investigación con trasplantes cerebrales, puede resumirse con las palabras de William Freed (1990), uno de los pioneros en los trabajos con trasplantes:

Una consecuencia desafortunada de la excesiva publicidad dada a los trasplantes de tejido cerebral, ha sido el pensar que pueden ser utilizados como un procedimiento terapéutico. En algunos casos, los trasplantes han sido aplicados tanto a la enfermedad de Parkinson, como en esquizofrenia, corea de Huntington, y parálisis progresiva supranuclear. Los trasplantes de tejido nervioso siguen siendo una técnica experimental y deberán ser aplicados a humanos sólo después de un seguimiento cuidadoso de ensayos terapéuticos⁹⁰.

2.1.

Estudios del sistema de proyecciones colinérgicas del cerebro anterior basal: Transplantes colinérgicos

Las estrategias utilizadas para describir la ubicación y función del sistema colinérgico han aplicado técnicas de lesión que permiten dilucidar la función por exclusión. Desgraciadamente para este sistema de neurotransmisión no se tiene una neurotoxina específica, por lo que se ha tenido que realizar correlaciones con otro tipo de excitotoxinas relacionadas a las neuronas colinérgicas, ya sea por medio de inyección estereotáxica de las toxinas a las áreas cerebrales, o por la administración sistémica prolongada de alcohol, la cual produce daños en el sistema de proyecciones colinérgicas similares a los producidos por las lesiones excitotóxicas del área septal medial y del núcleo basalis². Otros métodos que también se han utilizado son las manipulaciones farmacológicas por medio de inhibidores de síntesis, bloqueo de receptores, etc., así como transplantes neuronales (colinérgicos o no). Todos ellos han permitido correlacionar los efectos observados ante una serie de pruebas de recuperación funcional.

Los experimentos de lesiones en el NBM con diferentes excitotoxinas han otorgado una diversidad de datos que demuestran una disminución significativa en la actividad colinérgica en diferentes zonas corticales después de la lesión^{18, 27, 60, 68, 85}. Por ejemplo, las lesiones con ácido iboténico del NBM en ratas de 2 días de edad causaron pérdidas en la adquisición de la prevención pasiva y en la retención de prevención activa dos meses después de la lesión; también se observaron diferentes pérdidas en el laberinto de Lashley III y en el laberinto radial. El análisis histológico reveló una reducción en células marcadas con colinesterasa⁸⁵, una forma indirecta de marcaje que no necesariamente relaciona a las neuronas colinérgicas. También se han visto decrementos en la ejecución del laberinto en T posteriores a la lesión, principalmente durante la adquisición del condicionamiento espacial discriminatorio reforzado⁵⁹.

Por otra parte, existen varios trabajos que sugieren diferencias en los efectos conductuales producidos dependiendo de la excitotoxina utilizada. Dunnet y colaboradores³⁴ realizaron estudios bioquímicos e histológicos en ratas lesionadas en el NBM y concluyeron que las lesiones realizadas con ácido quisquálico eran las más selectivas para neuronas colinérgicas⁴⁵.

Posteriormente, al analizar los efectos conductuales, encontraron mayores pérdidas en el desarrollo y adquisición de la caja operante y menores deficiencias en la adquisición o ejecución del laberinto radial con reforzamiento en las ratas lesionadas con ácido iboténico en comparación con las ratas lesionadas con ácido quisquálico, a pesar de que este segundo grupo presentó una amplia disminución en los niveles de ChAT.

En este sentido, las lesiones unilaterales del NBM de ratas con ácido ftálico interrumpieron la memoria de trabajo pero no la de referencia en el laberinto en Y; en contraste con las lesiones de ácido quisquálico que no tuvieron ningún efecto. Los análisis bioquímicos confirmaron que las lesiones con ácido ftálico produjeron una gran disminución en la actividad de la ChAT en la amígdala basolateral, pero no afectaron la actividad de ChAT cortical en forma significativa⁶⁵.

Adicionalmente, los experimentos en ratas privadas de sus inervaciones colinérgicas normales por medio de lesiones excitotóxicas del NBM, y posteriormente transplantadas en la neocorteza con células del CAB fetal, mostraron la capacidad de los transplantes para reinervar masivamente³⁹ y formar conexiones sinápticas con el cerebro huésped²¹. Además de estos datos, también se ha encontrado que este tipo de transplantes promueve la recuperación conductual de diferentes paradigmas, tales como la prevención pasiva, memoria de trabajo, memoria espacial de navegación y atención visual^{31, 41, 73}.

El uso de nuevas metodologías, como el análisis *in vivo* de los niveles extracelulares de ACh en diferentes áreas del SNC, ha permitido confirmar los resultados *in vitro* de disminución de la actividad de ChAT, después de lesiones en regiones colinérgicas del CAB. Tal es el caso de los experimentos realizados por medio de microdiálisis* en la corteza frontal de ratas lesionadas previamente en el NBM con ácido quisquálico. Durante el muestreo se realizó una estimulación con alto potasio (a través de la solución de perfusión de microdiálisis), así como manipulación corporal (contacto de pelo o cola); el análisis de las fracciones reveló niveles de ACh significativamente menores en las ratas lesionadas a comparación de los niveles de ACh en las ratas intactas. Asimismo, cuando a las ratas lesionadas se les suministró transplantes del CAB fetal en la corteza frontal, dichos transplantes lograron igualar los niveles de

*La técnica de microdiálisis permite la toma de muestras del espacio extracelular de cualquier región del SNC mientras el animal se encuentra en libre movimiento, pudiéndose efectuar simultáneamente manipulaciones farmacológicas o conductuales.

ACh como los del control, durante la estimulación con alto potasio y la prueba conductual⁸².

Datos muy interesantes publicados recientemente¹⁰⁴ mostraron que el suministro continuo de ACh a la corteza fronto-parietal de ratas por medio de transplantes de fibroblastos manipulados genéticamente para liberar ACh constitutivamente puede mejorar las deficiencias en pruebas de navegación espacial provocadas por lesiones del NBM con ácido iboténico.

El Condicionamiento Aversivo a los Sabores

Los seres vivos a lo largo de la evolución han desarrollado la habilidad de asociar los estímulos medioambientales y sus consecuencias, es decir, aprender de las experiencias. El aprendizaje es, por lo tanto, uno de los más eficientes métodos desarrollados por las especies para lograr su supervivencia.

Los estímulos que pueden ser asociados por los animales son tan variados como el número de organismos vivos, siendo estas asociaciones las que tienden a configurar las conductas características de cada una de las especies. Un ejemplo notable del aprendizaje aplicado a la supervivencia de las especies es la asociación lograda entre los estímulos relacionados con los alimentos y la retroalimentación visceral que sigue de su ingestión, la cual determina en gran parte la futura conducta consumatoria en los animales y constituye un proceso contundente de aprendizaje⁵⁰. Este suceso permite a los animales asociar sabores arbitrarios con los efectos nutritivos o tóxicos después de que estos han sido ingeridos y de modo que en el futuro puedan distinguirlos.

A pesar de la lógica de las anteriores afirmaciones, fue hasta 1966 cuando John García y sus colaboradores, demostraron que los sabores pueden ser utilizados como estímulos condicionados (EC), los cuales son efectivamente asociados con irritación gástrica usada como estímulo incondicionado (EI). A esta asociación le dieron el nombre de condicionamiento aversivo a los sabores (CAS)⁴⁴.

En resumen, el CAS es un paradigma que consiste en la presentación de un sabor seguido por un malestar estomacal, el cual produce en el animal una aversión a la presentación subsecuente del sabor. Este condicionamiento puede desarrollarse después de un solo ensayo con la asociación sabor-irritación gástrica y, a diferencia de otros condicionamientos clásicos, el intervalo entre la presentación del EC y el

*El CAS en principio, puede considerarse como una forma de condicionamiento clásico, a pesar de no caer dentro del modelo de las cuatro variables del paradigma Pavloviano. Recientemente se han postulado soluciones para obtener una conceptualización más adecuada, las cuales no serán explicadas a lo largo de este texto ^{43, 80}.

El puede ser de una hora o más, estableciendo así fuertes aversiones al sabor.

Este condicionamiento ha sido una valiosa herramienta en el estudio de las bases neurofisiológicas de aprendizaje y la memoria, debido a que las estructuras nerviosas involucradas en esta conducta están bien definidas y localizadas⁵⁵. Los estudios anatómicos en mamíferos indican que los sistemas gustativo y visceral convergen en diversas áreas del SNC. Primeramente, los estímulos gustativos activan los receptores linguales conectados principalmente con los nervios craneales faciales (VII), glossofaríngeo (IX) y en menor medida con el par craneal vago (X); éstos a su vez, establecen relevos de primer orden con la porción anterior del núcleo del tracto solitario (NTS) en el tallo cerebral (figura 2)^{4, 99}. Así mismo el NTS recibe aferencias viscerales de las ramas hepáticas del nervio vago (sensitivas a irritación gástrica), aferencias del área postrema (sensible a toxinas en circulación periférica) y aferencias del sistema vestibular.

Las fibras ascendentes del NTS se dirigen principalmente al núcleo parabraqueal del puente (NPB) o área pontina del sabor donde también se han encontrado aferencias viscerales⁸⁸. Investigaciones más recientes que estudiaron inmunohistoquímicamente la distribución de la expresión del proto-oncogene *c-fos*, después de la inyección intraperitoneal de LiCl (la cual es comunmente utilizada para provocar malestar gástrico durante el CAS), mostraron la activación de las neuronas del NTS a través del nervio vago; así como la activación humoral y neuronal de las neuronas del área postrema (AP), con una predominancia en el lado derecho. Las neuronas activadas del NTS y del AP proyectaron principalmente al subnúcleo lateral izquierdo y ligeramente al subnúcleo lateral central del NPB¹⁰⁸.

A partir de este núcleo las fibras siguen dos vías; un grupo se dirige a estructuras del cerebro ventral como la amígdala central (que también puede recibir proyecciones directamente del NTS), el hipotálamo lateral distal y la sustancia innominata⁷⁵; el segundo grupo se proyecta a neuronas del núcleo ventromedial del tálamo, donde también se proyectan fibras *visceroceptivas* directas del NTS y que responden a estimulación eléctrica y química realizada en la rama hepática del nervio vago⁸¹. A partir de los núcleos talámicos, las fibras se proyectan hacia la neocorteza gustativa, concluyendo en la corteza insular (CI), áreas 13 y 14 de Broca (figura 2)⁵⁵.

La CI de la rata se encuentra localizada en la confluencia de la arteria cerebral media y el surco rinal. En 1955, Benjamin y Pfaffman⁷ describieron por primera vez esta región, y desde entonces existen diversos

trabajos que confirman su participación en las sensaciones gustativas. Entre ellos se encuentran estudios electrofisiológicos¹⁰⁶ que después de la estimulación gustativa en la lengua de ratas, encontraron respuestas fisiológicas en la CI. Más tarde¹⁰⁹, se logró identificar en la neocorteza gustativa células responsivas al tacto, estimulación termal y gusto provocado en la lengua de ratas, siendo la región ventral de la corteza gustativa (ya denominada CI) la que mayormente respondía al gusto. De la misma forma, se encontró que la mayoría de las neuronas gustativas del núcleo ventral posterior del tálamo proyectaban a esta área⁷⁶.

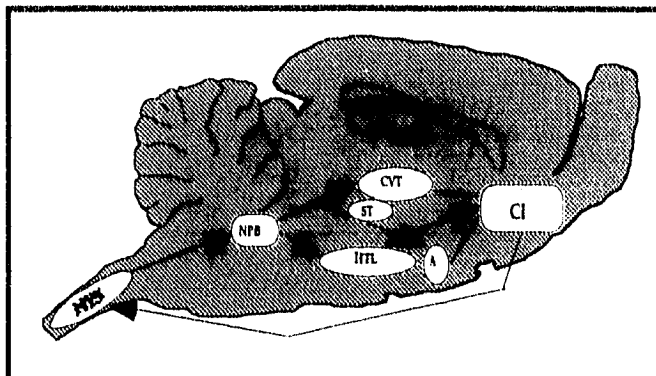


Figura 2. Principales conexiones de la corteza insular con otros núcleos del cerebro: (NTS) núcleo del tracto solitario, (NPB) núcleo parabraquial del puente, (CVT) complejo ventrobasal del tálamo, (ST) núcleo subtalámico, (HTL) hipotálamo lateral (A) amígdala y (CI) corteza insular.

Con los experimentos de Braun y Kiefer¹⁵ se obtuvieron datos sobresalientes acerca del papel de la CI en la percepción e integración sensorial. Estos investigadores estaban interesados en determinar el papel real de la CI en la percepción de los sabores, por lo que realizaron mediciones de consumo de diferentes concentraciones de quinina, salina y sacarosa después de haber lesionado la CI. Los resultados mostraron que las ratas con lesión cortical respondían de forma similar a los animales intactos. Se observó sólo un ligero incremento del consumo en la parte media del gradiente de concentración utilizado, lo que podría considerarse como una pequeña alteración de la discriminación fina de los sabores.

Los anteriores resultados fueron confirmados por otros grupos^{16, 49, 55} y concluyeron que la corteza insular no es importante para la percepción y discriminación de los sabores, en comparación de otras modalidades sensoriales cuya lesión del área cortical relacionada impide al organismo

la percepción. Lo sobresaliente radica en que las lesiones de la CI causan severas pérdidas en el aprendizaje y la retención del CAS, lo cual no se observa cuando se lesionan otras regiones corticales que también reciben información gustativa¹⁰⁷. Aunados a estos trabajos existen muchos otros que han confirmado la participación de la CI en procesos cognoscitivos referidos a estímulos gustativos^{8, 17, 29}.

Más recientemente, otras investigaciones⁸³ han involucrado un papel asociativo a la CI al mostrar que tanto los estímulos gustativos como los viscerales, producen pequeños incrementos en la síntesis de proteínas dentro de las células de la CI. Dicha síntesis aumenta considerablemente cuando se presenta el estímulo gustativo, previamente apareado con la irritación gástrica. Estos resultados sugieren que al confluir estímulos gustativos y viscerales en la CI, esta región de la neocorteza se convierte en una área importante para la integración de los estímulos involucrados en el CAS.

Por último, existen evidencias de que la lesión de la CI provoca pérdidas en otros tipos de aprendizaje, como la prevención pasiva^{7, 30} y el laberinto de agua de Morris⁷; lo que sugiere que la CI también participa en aprendizajes de tipo espacial y en aquellos paradigmas que presentan componentes de aversión.

3.1

Transplantes Corticales y Recuperación del Condicionamiento Aversivo a los Sabores

En una serie de intentos para tratar de discernir la participación de los transplantes de tejido nervioso fetal en los procesos de integración anatómica y reestablecimiento funcional, se pudo confirmar que la pérdida del aprendizaje del CAS ocasionada por lesiones en la CI, puede ser revertida cuando los animales lesionados reciben transplantes corticales fetales⁶. Estos transplantes fueron capaces de formar conexiones con el tálamo y la amígdala del huésped de manera similar a los animales intactos. Sin embargo, cuando el transplante provino de tejido heterotópico (i.e. distinto a CI fetal), los animales no mostraron una recuperación conductual y el tejido fue incapaz de establecer contactos sinápticos con el huésped³⁶. Asimismo, los estudios del curso temporal de recuperación conductual inducida por estos transplantes sugirieron que son necesarios 45 días posttransplante para obtener una clara recuperación del CAS, ya que a los 15 días no se pudo observar ninguna mejoría³⁸.

Posteriormente, con base en los antecedentes de perfusiones crónicas de NGF en animales con lesiones de fimbria fornix que ayudaron a recuperar las funciones de aprendizaje perdidas¹⁰³ y mejoraron el desarrollo cognoscitivo de ratas seniles¹⁰¹, en nuestro laboratorio se encontró que los transplantes de CI asociados con NGF, lograron acelerar la recuperación funcional de ratas lesionadas, a partir, de los 15 días posttransplante³⁷.

Por otra parte, retomando las diferentes evidencias que sustentan a la hipótesis colinérgica para el mantenimiento de las funciones cognoscitivas, existen varios antecedentes que han involucrado directamente al neurotransmisor ACh en la manutención del paradigma del CAS. Uno de ellos correlaciona las lesiones bilaterales con ácido quisquálico en el NBM con una significativa reducción de la actividad de la ChAT en la CI, lo que imposibilitó la adquisición del CAS e interrumpió la retención de la aversión en animales previamente entrenados. Igualmente afectó el aprendizaje de prevención pasiva⁶³. Sin embargo, en otros experimentos⁵⁴ donde se lesionó el NBM no se encontró ningún efecto sobre el CAS. Aunado a estos datos, se suman los experimentos donde se administró el antagonista muscarínico,

escopolamina en la CI, el cual bloqueó la adquisición pero no la consolidación del CAS*.

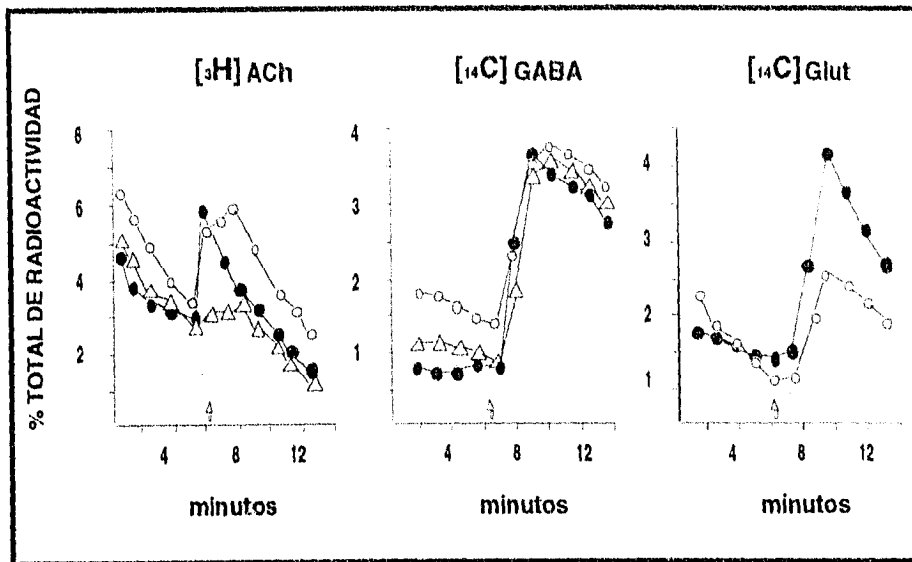


Figura 3: Liberación de $[^3\text{H}]$ Acetilcolina, $[^{14}\text{C}]$ GABA y $[^{14}\text{C}]$ L-Glutamato de corteza insular control (círculos negros), de transplantes homotópicos (círculos blancos) y de transplantes heterotópicos (triángulos); en presencia de 1.2 mM de Ca^{2+} . Los experimentos fueron realizados en rebanadas de cerebros, ante los amino ácidos correspondientes en líquido de perfusión, sustituyendo el medio con 47 mM de KCl a los 5 min (flecha), el análisis estadístico reveló sólo diferencias significativas para la liberación de $[^3\text{H}]$ ACh en los transplantes heterotópicos. Los autores mencionan una tendencia a la significancia para el caso de la liberación de $[^{14}\text{C}]$ L-Glutámico en transplantes homotópicos⁶².

Como antecedente directo de los resultados que se presentan en esta tesis, están los trabajos realizados en nuestro laboratorio⁶² con transplantes homotópicos de CI que promovieron la recuperación de la adquisición del CAS y fueron capaces de liberar $[^3\text{H}]$ ACh *in vitro*; así mismo, que los transplantes provenientes de tejido heterotópico (corteza occipital fetal) que no indujeron recuperación conductual y fueron significativamente deficientes en la liberación de $[^3\text{H}]$ ACh. De la misma forma, se observaron valores de liberación de $[^3\text{H}]$ ACh significativamente menores en los animales que, a pesar de haber recibido transplantes homotópicos, por alguna razón no fueron capaces de recuperar la conducta. En este mismo trabajo se encontró que las mediciones de liberación del

* Hernández-Echeagaray y Colaboradores, resultados no publicados.

neurotransmisor [^{14}C]ácido- γ -aminobutírico (GABA) no mostraron diferencias significativas entre los grupos control, trasplante homotópico y trasplante heterotópico. Adicionalmente, se encontró una tendencia de disminución (no significativa), en la liberación de [^{14}C]L-glutamato en el tejido proveniente de trasplantes homotópicos (figura 3).

En conclusión, el estudio del aprendizaje a través de las manipulaciones farmacológicas de la CI ha proporcionado una serie de evidencias que sugiere que el sustrato principal del aprendizaje del CAS podría estar ubicado en la CI. Así mismo, los trabajos con trasplantes corticales que promueven la recuperación del CAS han indicado la necesidad de que el tejido fetal a transplantar proceda de regiones cerebrales similares, para lograr una satisfactoria recuperación; lo que sugiere una especificidad en el tipo de tejido más que por algún factor difusible, como sería el caso de los trasplantes que no requieren de tejido homotópico para producir la recuperación funcional (i.e. sistema nigro-estriatal).

Aminoácidos excitadores: Participación en aprendizaje y memoria.

El conocimiento de la farmacología de los aminoácidos excitadores ha permitido en las dos últimas décadas avanzar en el entendimiento de la plasticidad nerviosa. Las señales de transmisión en las sinapsis neuronales son mediadas por una variedad de receptores específicos a la interacción de neurotransmisores que transfieren información en las células blanco. La gran mayoría de las sinapsis en el SNC para provocar una excitación neuronal rápida usan el neurotransmisor glutamato. Es así que los receptores de glutamato median la mayor parte de la neurotransmisión excitatoria en el cerebro y por ello están involucrados en el aprendizaje, en la adquisición de la memoria^{26, 56}, y en algunos desórdenes degenerativos relacionados con la neurotoxicidad⁷¹.

Por ejemplo, en el caso de isquemia e hipoglicemia, la estimulación masiva de los receptores a glutamato, por exceso de neurotransmisión glutamatérgica, deteriora la actividad neuronal provocando la degeneración y la muerte celular. La neurotoxicidad del glutamato también puede ser la base de las enfermedades neurodegenerativas lentas y progresivas, como la enfermedad de Huntington y de Alzheimer⁷¹.

Los receptores de glutamato pueden ser categorizados, con base en estudios farmacológicos, electrofisiológicos y bioquímicos^{22, 89}, dentro de dos grupos denominados ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos poseen un canal iónico integral, catión específico. Estos pueden clasificarse a su vez en receptores tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y en receptores tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA)-kainato, respecto de sus agonistas selectivos. En comparación, los receptores metabotrópicos están asociados a una proteína G y modulan la producción de segundos mensajeros intracelulares. La utilización de técnicas recombinantes de ADN está logrando un rápido avance en el entendimiento de las estructuras, propiedades, y expresión de los receptores a glutamato^{87, 89, 93}.

Debido al postulado de que la memoria deberá codificarse en el cerebro a través de cambios a largo plazo en la eficiencia sináptica producidos por el uso anterior de la sinápsis, se ha considerado que la plasticidad neuronal debida por glutamato, la cual está ejemplificada

por la potenciación a largo plazo (LTP, siglas dadas en inglés) en el hipocampo y por la depresión a largo plazo (LTD) en el cerebelo, puede ser uno de los procesos fundamentales que subyacen al almacenaje de la información en el SNC.

En 1973, Timothy Bliss y Terje Lomo demostraron que las neuronas del hipocampo poseían una notable capacidad plástica con el tipo de habilidades que se requerían para el aprendizaje. Encontraron que una breve serie de alta frecuencia de potenciales de acción en una de las vías neurales (CA1) del hipocampo intensificaba la fuerza sináptica en dicha vía, logrando mantenerse a lo largo de semanas. Este refuerzo fue denominado LTP. Desde entonces la LTP en el área CA1 del hipocampo es la forma de plasticidad sináptica activo-dependiente más estudiada en el sistema nervioso de vertebrados. Se ha establecido que, para el caso de CA1, es absolutamente necesaria la activación de los receptores NMDA, debido a que los antagonistas de este receptor bloquean totalmente la inducción de LTP. Los primeros experimentos fueron realizados con AP5, antagonista competitivo específico, pero posteriormente se comprobó que otras clases de antagonistas, como el MK801, bloqueador del receptor ionotrópico, y 7-clorokinurenato, antagonista del sitio alostérico de la glicina, también son efectivos para la inhibición de la LTP⁹⁴.

El descubrimiento de que la LTP se da en el hipocampo, una región ampliamente relacionada con el almacenamiento mnémico, ha motivado a estudiar otras áreas también relacionadas con este tipo de procesos, así como tratar de relacionar la LTP con alguna conducta específica. Las investigaciones realizadas por el grupo de Richard Morris en un laberinto de agua para estudiar la memoria espacial sugirieron una alta correlación de estos sucesos. Los experimentos probaron que al bloquearse los receptores de NMDA del hipocampo de ratas con AP5, éstas perdieron la capacidad de ejecutar adecuadamente la tarea en el laberinto de agua o del laberinto radial⁹⁴.

Posteriormente una serie de evidencias ha descrito la participación de los receptores a glutamato en diferentes paradigmas y áreas del SNC. Tal es el caso de la amígdala, donde además de haberse descrito LTP²⁵ se encontraron pérdidas en el desempeño de prevención pasiva y del condicionamiento Pavloviano de respuesta al miedo⁵⁷ después del tratamiento con antagonistas del receptor a glutamato.

A pesar de los anteriores antecedentes el LTP continúa siendo una hipótesis sobre un probable mecanismo biológico subyacente al almacenaje de la información a largo plazo en el cerebro de mamíferos. Queda aún por

establecer los diversos efectos producidos por los diferentes antagonistas glutamatérgicos (en la adquisición y la evocación), y por el tipo de paradigma conductual utilizado y las áreas cerebrales estudiadas. La descripción y función de las diferentes clases de receptores, podrán proveer una mayor claridad en las particularidades de los paradigmas estudiados.

Planteamiento del problema



Los antecedentes expuestos en el marco teórico han sugerido que los trasplantes corticales que promueven la recuperación del CAS deberán provenir de tejido fetal de regiones cerebrales similares para lograr una satisfactoria recuperación. Por otra parte, los reportes de estudios bioquímicos *in vitro* en los trasplantes de CI también han sugerido una correlación directa entre la recuperación conductual y el neurotransmisor ACh. De la misma forma, los reportes de bloqueadores colinérgicos (i.e. escopolamina) en animales intactos favorecen la teoría colinérgica del aprendizaje.

Sin embargo, a pesar de estos antecedentes aún no se ha establecido si en el tiempo requerido (45-60 días) para la recuperación mediada por los trasplantes homotópicos, involucra la recuperación paralela de los niveles colinérgicos. ¿Es necesario el reestablecimiento de los niveles de ACh para posteriormente observar la recuperación conductual? o ¿la recuperación de los niveles colinérgicos es consecuencia de otros procesos que desembocan finalmente en el reestablecimiento funcional?

Es evidente la existencia de dos problemas aún no resueltos: por un lado el análisis de los niveles extracelulares de ACh en el animal intacto durante el tiempo requerido para observar una recuperación conductual mediada por los trasplantes en la CI; y por el otro la descripción del comportamiento de liberación de ACh, bajo la estimulación fisiológica en los trasplantes homotópicos y heterotópicos de animales en libre movimiento.

De la misma forma, todavía queda por resolver la posible participación de otros sistemas de neurotransmisión que, como mencioné en la introducción, han sido ampliamente relacionados con aprendizaje y memoria. Un caso relevante es el aminoácido excitatorio L-glutamato, el cual podría desempeñar un papel importante en el aprendizaje del condicionamiento aversivo. Desafortunadamente, existen muy pocas evidencias de la participación de este neurotransmisor en el paradigma del CAS; los estudios con antagonistas a receptores a L-glutamato son poco claros y prácticamente, son inexistentes los trabajos de caracterización de receptores a L-glutamato en la CI.

Con base en esta serie de interrogantes se plantearon los siguientes objetivos tratando de abordar por un lado las preguntas relacionadas a la participación de la ACh en la recuperación mediada por trasplantes homotópicos y por otro, describir algunos aspectos omitidos hasta ahora, sobre la participación de los receptores a L-glutamato en la CI intacta y en el tejido transplantado.

Objetivos



1. Descripción *in vivo* de los niveles extracelulares de Acetilcolina de transplantes fetales en la corteza insular a través de microdiálisis en libre movimiento.

1.1. Análisis de los niveles extracelulares de ACh en transplantes homotópicos y heterotópicos en la CI a los 15 y 45 días postransplante.

1.2. Descripción del comportamiento de liberación de ACh en transplantes homotópicos y heterotópicos en la CI ante la estimulación con KCl.

2. Caracterización de algunos de los receptores a L-glutamato en la CI por medio del análisis del desplazamiento de unión específica al receptor de L-glutamato ante diferentes agonistas y antagonistas.

2.2. Análisis del desplazamiento de unión específica al receptor de L-glutamato en transplantes homotópicos y heterotópicos de la CI a los 45 días postransplante.

Materiales y Métodos



En todos los experimentos se utilizaron ratas macho, adultas, con peso alrededor de 250-300g al inicio de los experimentos; se mantuvieron en cajas separadas bajo un ciclo de 12 horas luz-oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*, excepto los días sujetos a condicionamiento.

Los animales se dividieron en 5 grupos: un grupo con trasplantes de CI fetal entrenado en el CAS 15 días después de haber sido transplantado (CI-15), un grupo con trasplantes de CI entrenado en el CAS 45 días postransplante (CI-45), un grupo con trasplante de corteza occipital fetal entrenado 45 días postransplante (CO-45), un grupo de animales lesionados y un grupo de animales control (CON).

Lesión.

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (50mg/Kg), por medio de un estereotáxico, inyecciones bilaterales de NMDA (10 µg/ ml, 0.8 µl cada lado) en ambas cortezas insulares (AP= +1.2 mm; L= +/- 5.5 mm; V= -5.5 mm). La solución de NMDA se inyectó a una velocidad de 0.2 ml/min, dejando la punta de la jeringa 4 min dentro del área de inyección. Cinco días después de la cirugía, las ratas control y lesión fueron privadas de agua y entrenadas para el Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS).

Transplante.

Al terminar la prueba del CAS, las ratas lesionadas fueron transplantadas con células fetales disectadas de la corteza occipital (CI) o de la corteza occipital (CO) de fetos de 16 días. Los trasplantes fueron

colocados en la CI bajo las mismas coordenadas utilizadas en el procedimiento de lesión.

15 o 45 días después del trasplante, las ratas fueron reentrenadas para obtener un nuevo CAS y así conocer la recuperación conductual.

Condicionamiento Aversivo a los Sabores.

Los animales fueron habituados a beber diariamente agua durante sesiones de 15 min. Cinco días después de la habituación en el consumo de agua, las ratas fueron sometidas a la adquisición del CAS, que consistió en la presentación de un estímulo gustativo condicionado en lugar de agua (Sacarina al 0.1%), seguido de una inyección intraperitoneal de 0.4 LiCl. Cuatro días después de la adquisición los animales fueron reexpuestos al estímulo gustativo (prueba) y la ingesta fue registrada como el índice de aversión (figura 4).

Implantación de guías cánula para microdiálisis.

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (50 mg/Kg de peso). Las guías se colocaron esterotáxicamente (coordenadas: AP= +1.2 mm, L=±5.5 mm, V=-5.5 mm) y fueron sementadas con acrílico dental, por medio de 3 tornillos sujetos a dura. El período de recuperación postcirugía fue de una semana.

Microdiálisis en libre movimiento.

La toma de muestras se llevó a cabo por medio de una sonda de microdiálisis (3 mm de largo, figura 5), la cual obtuvo muestras del espacio extracelular de una forma limpia e inmediata para su análisis. Con esta técnica bioanalítica se obtienen sólo compuestos de bajo peso molecular, excluyendo moléculas protéicas (enzimas), y no existe riesgo de que accidentalmente se succione parte del tejido durante el muestreo. En los experimentos se utilizó el sistema de microdiálisis BAS (CMA/120) para animales en libre movimiento.

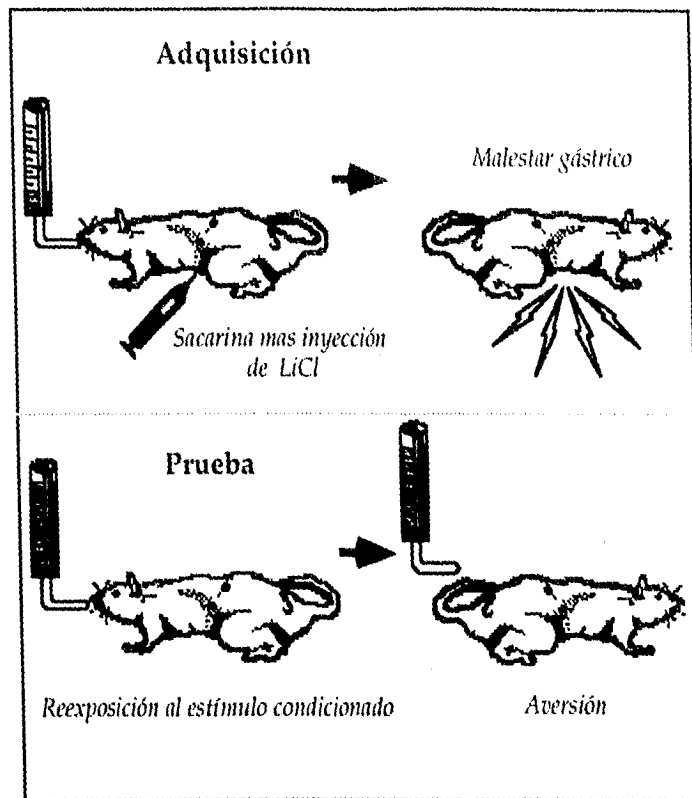


Figura 4 : A. Esquema del CAS durante la adquisición y prueba (evocación).

El día del muestreo, la sonda de microdiálisis se colocó a través de las guías cánula, previamente sementadas en el cráneo de los animales, y se perfundió en forma continua con 2 μ l/min de solución Ringer.

Todos los experimentos de microdiálisis consistieron del siguiente procedimiento:

- Adormecimiento del sujeto en una cámara de éter para facilitar la colocación de la sonda de microdiálisis.
- Ya colocado el sujeto en la campana de microdiálisis, se dejó perfundir solución Ringer (2 μ l/min) durante 45 minutos para la equilibración de la diálisis.

■ Después de una hora de equilibración se empezó el muestreo de las fracciones basales ($2\mu\text{l}/\text{min}$, 15 min) siendo congeladas inmediatamente a -80° hasta su posterior análisis por HPLC.

■ La tercera fracción fue perfundida con solución Ringer más KCl 56mM para estimular la liberación de neurotransmisores.

■ Las fracciones restantes fueron perfundidas como las dos fracciones iniciales (solución Ringer $2\mu\text{l}/\text{min}$, 15 min).

■ Al finalizar el análisis los sujetos se colocaron de nuevo en sus cajas independientes y se observaron por un par de horas para verificar la ausencia de efectos secundarios.

El análisis de las fracciones obtenidas durante el muestreo, se realizó a través de un HPLC adaptado a un sistema especial para la determinación de ACh y Colina.

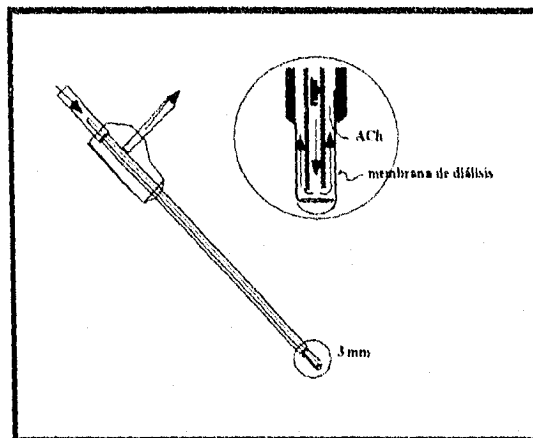


Figura 5. Esquema de una sonda de microdiálisis utilizada para obtener muestras del espacio extracelular del SNC.

Cuantificación de ACh por HPLC.

Las muestras colectadas a través de microdiálisis fueron analizadas en su contenido de ACh a través de HPLC (Beckman) y detección electroquímica (BAS), con una fase móvil de buffer fosfatos 50mM pH 8.5. Las fracciones se inyectaron en una columna polimérica de

fase reversa (BAS), unida a un reactor enzimático que convierte la ACh a Ch, que a su vez es convertida en betaina y peróxido, el cual es electroquímicamente cuantificado.

Histología.

Al finalizar las pruebas conductuales y bioquímicas (microdiálisis en libre movimiento) todos los grupos fueron anestesiados y perfundidos a través de la aorta ascendente con una solución al 4% de paraformaldehído en buffer fosfato (0.15 M, pH 7.4).

Unión específica al receptor de L-glutamato.

Para el análisis de unión de los agonistas y antagonistas a los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de L-glutamato, se utilizaron como desplazadores de $^3\text{HL-Glu}$ los siguientes análogos:

- NMDA (+glicina) y sus antagonistas CPP y MK801
- AMPA/KA y su antagonista DNQX
- El agonista metabotrópico trans-ACPD y su antagonista MCPG.

Después de las pruebas conductuales posteriores a la colocación de los transplantes, las ratas de los respectivos grupos fueron decapitadas y sus cerebros fueron rápidamente extraídos para disectar los transplantes corticales y las cortezas de los grupos control, el tejido de cada uno de los animales pertenecientes al mismo grupo se unió y se congeló a -80° . El procedimiento para la extracción de las membranas consistió en la homogenización del tejido en 20 volúmenes de agua (choque osmótico). Después de reposar 15 min en hielo, las membranas fueron agrupadas en *pellets* por medio de centrifugación (45,000 g, 20 min, 4°); se lavaron tres veces y fueron resuspendidas en buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.1. Después de la incubación por 30 min, las suspensiones fueron recentrifugadas y los *pellets* se dejaron 48 h en refrigeración antes de continuar. Para el ensayo de unión las membranas fueron descongeladas y resuspendidas por homogenización en buffer Tris-HCl 0.05 M (pH 7.4 en ausencia de NaCl). Se incubaron de 50 a 60 μg de proteína de membrana en presencia de 50 nM $^3\text{HL-Glu}$ en un volumen final de 175 μl , durante 15 min a 4° . Se utilizó 1 mM de L-Glu no marcado para determinar la unión no específica. El L-Glu no marcado fue sustituido por los agonistas y antagonistas del receptor a

L-Glu anteriormente mencionados; la reacción fue detenida por centrifugación a 90,000 rpm durante 2 min. Los *pellets* fueron ligeramente enjuagados con buffer frío, resuspendidos en SDS al 0.2% y digeridos por medio de calor toda la noche. Las muestras fueron cuantificadas en su radioactividad por medio de un contador de centelleo y solución tritosol. La cantidad de proteína de cada uno de los grupos fue determinada por el método de Lowry et al⁶⁴.

Análisis estadístico.

Los registros conductuales se obtuvieron tomando el porcentaje de consumo de sacarina con respecto a la línea base del consumo de agua. Estos valores se analizaron mediante análisis de varianza de ANOVA de una vía. La concentración de ACh obtenida por HPLC fue evaluada comparando las diferentes concentraciones del neurotransmisor entre los diferentes grupos, usando estadística paramétrica y los análisis post hoc apropiados.

Resultados



Recovery of Taste Aversion Learning Induced by Fetal Neocortex Grafts: Correlation with *In vivo* Extracellular Acetylcholine

enviado a Brain Research

Recovery of Taste Aversion Learning Induced by Fetal Neocortex Grafts: Correlation with *In Vivo* Extracellular Acetylcholine

María Isabel Miranda, Ana María López-Colomé, Federico Bermúdez-Rattoni

*Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional
Autónoma de México, 04510 México, D.F.*

*Key words: Behavioral recovery; Conditioning taste aversion; Free moving microdialysis; Fetal
brain graft*

Two groups of rats showing disrupted taste aversion due to insular cortex (IC) lesions, received a transplant of either homotopic cortical or heterotopic (occipital cortex, OC) tissue, obtained from 16 day-old fetuses. Behavioral results showed that the functional recovery induced by IC grafts followed a time course: at 45 days but not at 15 days post implant, the subjects showed significant recovery in the acquisition of taste aversion. Moreover, comparison of the taste aversion score 45-days post-graft, revealed that homotopic grafted animals improved significantly taste aversion, whereas those receiving heterotopic grafts did not. *In vivo* microdialysis of acetylcholine (ACh) release showed that the group receiving homotopic grafts tested 45 days post-graft had similar release of ACh after KCl stimulation to those in the control group. Homotopic grafted animals at 15 days post-graft and groups with heterotopic transplants at 45 days post-graft showed significantly lower ACh levels compared with the controls after depolarization. Furthermore, homotopic grafts and lesioned groups showed significantly weaker specific receptor binding of [³H]L-Glutamate (L-Glu) compared with controls. These results suggest that ACh, and not other neurotransmitters (i.e. L-Glu), is specifically involved in the processes of behavioral recovery induced by homotopic cortical transplants and seems to play an important role in taste aversion learning.

In a number of experiments, it has been well established that brain grafts can survive and establish anatomical and functional connections to their host tissue^{3, 4, 5, 16, 21, 27}. Furthermore, several reports indicate that neural grafts can promote the recovery of cognitive deficits in lesioned animals through a variety of behavioral procedures^{2, 17, 21}. In the same way, involvement of cholinergic activity in learning and memory processes has been demonstrated. Thus, experiments using intracerebral transplantation of fetal tissue^{15, 23, 38}, lesions of cholinergic nuclei^{13, 14, 40}, pharmacological manipulations^{12, 36, 37} and anatomical changes in cholinergic pathways during ageing^{1, 44}, have all strongly supported a correlation of cholinergic activity with cognitive processes, which seems to confirm the role of this system in learning events^{7, 25, 42}.

Similarly, L-Glu, the main excitatory neurotransmitter in the CNS, has been implicated in neuronal plasticity and cognitive functions such as learning and memory in the vertebrate nervous system⁸. Thus, a number of studies have demonstrated that intraventricular or intracerebral applications of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists (i.e. 2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) and 3-(RS)-(2-carboxypiperazine-4-yl) propyl-1-phosphonate (CPP)), disrupted a variety of learning tasks⁹, such as inhibitory avoidance²⁹ and Pavlovian fear conditioning¹¹.

Conditioning Taste Aversion (CTA) is a model that has been widely used for studying the neurobiology of learning processes. In this model, the animal acquires aversion to a taste cue when it is followed by digestive malaise. The CTA model clearly contains defined anatomical substrates²⁸ that have been established with the use of anatomical, electrophysiological and behavioral methods^{6, 28}. In this regard, it has been shown that bilateral lesions of the IC disrupt the ability to acquire and retain CTA^{6, 30}. In our laboratory, we have demonstrated that CTA learning deficiencies could be reversed when cortical lesioned rats received fetal cortical grafts². Analysis of the time course of the behavioral recovery induced by cortical grafts after IC lesions, demonstrated that the subjects did not show recovery in the CTA paradigm after the initial 15 days post implant, whereas a strong recovery was observed at 45 days post-graft²⁰. In addition, biochemical measurements of the release of radioactive ACh, γ -aminobutyric acid (GABA) and L-Glu in IC grafts showed a positive correlation between the release of ACh and behavioral recovery³². More recently¹⁹, an

acceleration of behavioral recovery has been demonstrated when homotopic fetal tissue supplement with nerve growth factor (NGF) was transplanted in IC lesioned rats, that correlated with the reestablishment of choline acetyltransferase (ChAT) activity in the grafts at 15 days post implantation. However, there is scarce information regarding the *in vivo* release of ACh during the time of behavioral recovery.

This report comprises two experiments. In the first experiment, we have used the *in vivo* microdialysis technique to correlate ACh release with the recovery of the ability to acquire taste aversion by fetal brain grafts in IC lesioned rats. ACh release from fetal tissue implanted in the IC was measured 15 and 45 days post-graft. In the second experiment, we investigated the role of excitatory amino acid receptors in the behavioral recovery promoted by fetal cortex grafts, looking at the effect of different agonists and antagonists on [³H]L-Glu receptor specific binding at 45 days post-graft.

Sixty two male Wistar rats weighing 250-300 g at the time of surgery, were used. They were housed under a 12 h light-dark cycle, with food and water *ad libitum*, except during a behavioral test. The rats were anaesthetized with pentobarbital (50mg/Kg) and received bilateral injections of NMDA (Sigma; 10 µg/µl of 0.1M phosphate buffer, 0.08 µl each side) stereotaxically into the IC (AP= +1.2 mm; L= +/- 5.5 mm; V= -5.5 mm). The NMDA solution was injected over 5 min (0.2µl/min) and the syringe was left *in situ* for another 2 min before it was removed.

Five days after surgery, the control group (CON, n=12), and the lesioned groups (n=50), were deprived of water for 24 hrs and trained to drink water twice a day during 10 min trials for 5 days. Once a consumption baseline was reached, water in the graduated tube was substituted with 0.15 M LiCl solution in order to induce taste aversion. Baseline was recorded for three more days and, on the fourth day, water was substituted for 0.15 M NaCl solution in order to test taste aversion. Extinction of the aversion was achieved over the next two days by introducing 0.15 M NaCl solution instead of water. The same training procedure was repeated for some groups at 15 days (IC-15, n=7), or 45 days (IC-45, n=21; OC-45, n=18) after grafting to determine recovery of the ability to acquire CTA (see below).

After lesion and the first behavioral CTA training and testing, the group of lesioned rats received cell suspension grafts of fetal tissue dissected from either the IC or OC of 16-day-old rat fetuses. Transplantation techniques were performed as previously described^{2, 18}. Briefly, fetuses were removed from the abdominal cavity of pregnant rats under pentobarbital anesthesia (50 mg/Kg) and their brains were carefully extracted. Tissue blocks about 1 mm³ volume were dissected in 10-20µl of physiological saline solution, from the region corresponding to the temporoparietal area (above the rhinal sulcus) and from the OC. With the aid of a 50µl Hamilton syringe, 3µl of dissected tissue were injected (slowly, over 10 min) at each side, into the IC area with the same stereotaxic coordinates used for producing the lesion.

At the end of the second behavioral procedure (post-graft test), the animals in the post implant group were randomly divided; 25 were used for experimental microdialysis procedure and the remaining 37 for glutamate receptor binding assay. The microdialysis groups consisted of the groups of 15 days post-graft (IC-15, n=7), 45 days post-graft (IC-45, n=6; OC-45, n=4), and control (CON, n=8). The rats from each group were anaesthetized with pentobarbital and the guide cannulas (CMA/12-Bioanalytical Systems, BAS, Indiana) were stereotaxically implanted into the right IC at the following coordinates: AP= +1.2 mm; L=+ 5.5 mm; V= -3.0 mm. The guide cannulas were kept in place with three skull screws and dental glue. Two days after cannula implantation, dialysis was started by connecting the probe inlet (dialysis probes CMA/12 from BAS with a 3 mm total length of membrane) to the microinfusion pump system (BAS), which perfused the probe continuously at a rate of 2 µl/min with Ringer solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, and 2.5 mM CaCl₂) containing neostigmine bromide (Sigma, 10 mM) in order to prevent ACh degradation. Once the probe was connected to the guide cannula, the first 1 hour sampling was discarded, and 6 samples were collected every 15 min (30µl/sample) and immediately frozen at -80°C or analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The general microdialysis procedure was as follows: during the two first samples the perfusion medium contained only the Ringer solution; KCl (56 mM) was added to the perfusion medium during sample three (while the NaCl concentration was lowered to 82 mM in order to maintain physiological osmolarity); the next 4 samples were perfused with Ringer solution, as the first 2. The collected samples

were assayed for ACh content using HPLC (Beckman) with electrochemical detection (BAS). The samples were injected into a polymeric reversed phase column (BAS); ACh and choline were then converted into hydrogen peroxide and betaine in a post column enzyme reactor containing immobilized AChE and choline oxidase (BAS). The hydrogen peroxide was detected electrochemically by a platinum electrode set at 500 mV (vs Ag/AgCl). The mobile phase consisted of a 50 mM sodium phosphate-buffered (pH 8.5) and Kathon reagent (BAS). The detection limit was approximately 0.1 pmol.

One day after microdialysis, the rats were deeply anaesthetized with pentobarbital and transfused transcardially with a 4% solution of paraformaldehyde in phosphate buffer (0.15 M pH 7.4). The brains were placed overnight in paraformaldehyde and then transferred to a 20% buffered sucrose solution and stored at 4 °C until they were cut. Coronal sections (50 µm thick) were taken through the areas of the probe and transplants. The sections were stained for Cresyl-violet.

For the second experiment, the glutamate receptor binding assay, five groups of animals were used: homotopic 45 days post-graft, (IC-45, n=15); heterotopic 45 days post-graft, (OC-45, n=14); lesion, (LS, n=4); both, IC (CON), and olfactory cortex control (OLF-C), (n=4) were obtained from the same animals. After the final post-transplant behavioral assay the rats were decapitated and their brains removed in order to dissect the cortical transplants, and the tissue from the animals in each individual group was pooled and quickly frozen to a temperature of -80°C. The procedure for extracting the membranes was the following: Control or graft tissue was osmotically shocked by homogenization in 20 vols of distilled water (w/v). After 15 min on ice, membranes were pelleted by centrifugation at 45,000xg for 20 min at 4°C, washed three times and resuspended in the same volume of Tris-HCl buffer 0.1 M, pH 7.1. After incubating the membranes for 30 min at 37°C, suspension was recentrifuged and pellets were frozen for at least 48 h prior to the assay. For binding assays membranes were thawed and resuspended by homogenization in Tris-HCl buffer 0.05 M, pH 7.4 in the absence of NaCl, and used for the assay, as previously described³¹. 50 to 60 µg of membrane protein were incubated in the presence of 50 nM [³H]L-Glu (New England Nuclear, sp. act. 54.7 Ci/mmol) in a final volume of 175 µl, for 15 min, at 4°C. 1 mM unlabeled L-Glu was used for defining non-specific binding.

Agonists and antagonists of L-Glu receptors, at the concentration indicated in each case, substituted for unlabeled L-Glu. When α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) was tested, 2.5 mM CaCl₂ and 100 mM KSCN were included in the test buffer. The reaction was stopped by centrifugation at 90,000 rpm for 2 min, in an air-driven microcentrifuge. Pellets were superficially rinsed twice with cold buffer, resuspended in 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS) and digested in a hot plate overnight. Samples were counted for radioactivity in a Beckman scintillation counter, after the addition of 5 ml of tritosol ²²; corrections were made for quenching and counting efficiency. Protein was determined by the method of Lowry et al.³⁴.

Figure 1-A indicates the location of the transplants from the groups used for the *in vivo* microdialysis analysis. The homotopic and heterotopic brain transplants appeared to be healthy and placed in the appropriate target area of the host brain (Figure 1-B). In all experimental groups, the location of the microdialysis probe was within the insular cortex. All grafts or cannulas found outside the target area were discarded for further analysis.

The results of the CTA for both experiments are shown in Figure 2-A. Control groups for 15 and 45 days post-graft did not show any significant differences, and hence they were combined into a single group designated the control group (CON). Simple ANOVA of the pre-graft test trial, showed significant differences among groups ($F_{3,54}=34.59, p<.0001$). As expected, bilateral insular cortex lesions (IC-15, IC-45 and OC-45) caused significant loss of taste aversion learning; control rats showed strong reduction of NaCl consumption in the taste trial as compared to baseline intake, while none of the IC lesioned groups showed any decrease in consumption. ANOVA comparisons at 15 and 45 days after grafting, revealed significant differences among groups ($F_{3,54}=23.26, p<.0001$). The IC-45 group showed markedly reduced NaCl consumption, which was similar to that of the control group, indicating a recovery of taste aversion, while the IC-15 and OC-45 groups did not show an improvement (post-graft test, fig 2-A) and remained statistically different from the control group ($p's<.01$ respectively).

Extracellular levels of ACh from the first 3 fractions measured showed no significant differences compared to the control group. The values of ACh of all groups were transformed to a percentage of the baseline, i.e. the mean average of

the 3 first samples collected, while subsequent samples represented the percentage relative to the basal value, prior to statistical analysis (Figure 2-B). One-way ANOVA comparisons were made in the 4, 5 and 6 samples, with post-hoc analysis using a Fisher test when appropriate.

Figure 2-B shows the percentage increase of the ACh levels after the KCl depolarization in the transplant (IC-15, IC-45 and OC-45) and control (CON) groups. ANOVA of percent ACh levels revealed significant differences ($F_{3,21}=4.17$, $p<.05$) among groups in the fraction 5 and a tendency towards significant difference in the fraction 4 ($F_{3,21}=2.517$ $p=.086$). The group that received homotopic grafts and were tested 45 days post-graft (IC-45) showed ACh levels similar to those in the control group during the fractions 4, 5 and 6; however, the group with homotopic graft tested 15 days post-graft (IC-15) only showed differences ($p<.02$) in the fraction 5 compared with the control groups. Similarly, the heterotopic transplant group after 45 days post-graft (OC-45) showed major differences ($p's<.02$) in the fractions 4 and 5. Furthermore, both groups IC-15 and OC-45 showed significant differences ($p's<.02$) compared with the homotopic group 45 days post-graft. No significant differences were found in the fraction 6. Moreover, a significant negative correlation ($p<.01$) between the extracellular levels of ACh measured *in vivo* during fraction 5 and the post-graft consumption of NaCl during the test of CTA, was determined by Spearman rank correlation (Figure 2-C).

In order to analyze possible effects on L-Glu receptor populations, agonists and antagonists of ionotropic and metabotropic L-Glu receptors were tried as displacers of [3 H]L-Glu: NMDA (+glycine) and its antagonists, CPP and dizocylpine maleate (MK-801); AMPA/kainate (KA) and their antagonist 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX); the metabotropic agonist (1S,3R)-1-aminocyclopentane-1,3- dicarboxylate (t-ACPD), and its antagonist L-methyl-4-carboxiphenyl glycine (MCPG); and the general agonist L-Glu. Control IC and OLF-C showed similar displacement by all analogues but L-Glu, which was significantly weaker in IC. This could be due to a different affinity or a higher receptor concentration in OLF-C compared to IC. Lesioned groups showed a marked decrease in specific displacement of all subtypes of L-Glu receptors. A partial recovery of specific L-Glu binding sites was observed in grafted animals;

however, this increase seems not to be specific neither to the receptor type nor to the type of transplant (homotopic or heterotopic) (Table 1).

ANOVA analysis showed significant differences among groups for L-Glu ($F(4,48)=8.90$, $p<0.01$), AMPA ($F(4,50)=3.69$, $p<0.01$), t-ACPD ($F(4,46)=4.25$, $p<0.01$), MK801 ($F(4,48)=3.96$, $p<0.01$), as well as for KA ($F(4,50)=2.83$, $p<0.05$), CPP ($F(4,47)=2.75$, $p<0.05$), DNQX ($F(4,50)=3.03$, $p<0.05$), and NMDA (plus Glycine) ($F(4,48)=2.55$, $p<0.05$); whereas there were no significant differences for MCPG ($F(4,47)=2.36$) and NMDA ($F(4,48)=2.07$).

The control groups (CON and OLF-C) showed a similar inhibition of $^3\text{H-L-Glu}$ binding for all the agonist and antagonist tested. Values for specific displacement of lesioned group were significantly different from all competing drugs used as compared with the control. Values for homotopic transplant group (IC-45) was significantly different from specific displacement of AMPA, KA and NMDA (fisher's PSLD test $p's<0.05$) as compared with the control, although this group showed clear increase compared with the lesion group (table 1). The specific displacement for heterotopic (OC-45) grafted animals in contrast, showed no significant differences for any of the competing drugs tested compared with the control. This might indicate that although in both grafted groups there is recovery, the proportion of different glutamate receptors subtypes differs in each case.

In line with previous observations^{2, 18}, the present results showed that fetal homotopical grafts were able to induce recovery of CTA learning in IC-lesioned rats, whereas heterotopic grafts produced a non significant improvement in learning deficits. Similarly, the results showed that behavioral recovery produced by homotopic transplants is correlated with the release of ACh by KCl stimulation.

One apparently contradictory result of these experiments was the extracellular levels of ACh in the lesioned animals, which showed no significant differences with regard to the ACh levels in the control group (data not shown). These results may be explained by the possibility of the microdialysis probe covering a larger area in the IC (3 mm) during perfusion, than that of the NMDA induced lesion, which is usually somewhat reduced in size and leaves no space like i.e. electrolytical lesions did. It is possible, thus, that in lesioned rats extracellular

levels of ACh could come from areas surrounding the lesioned IC, still capable of releasing ACh but not of inducing the recovery of taste aversion (see figure 2-A, pre-graft test). Conversely, the levels of ACh observed in the transplanted groups (IC and OC) reflect the release from the transplanted tissue, since the majority of the graft tissue grew sufficiently to cover almost all of the microdialysis probe (see Figure 1-B).

The results reported here are in agreement with previous work³² showing that fetal IC grafts promoted recovery of learning and the release of GABA, ACh and L-Glu in response to KCl depolarization. Although occipital cortical grafts did not induce behavioral recovery, they did release GABA, but not ACh. Moreover, IC-grafted rats tested 60 days post-graft, in which behavioral recovery was not observed, were also unable to release ACh. These results agree with the idea that cholinergic transmission is important in the IC for recovering the ability to acquire taste aversion and suggest a direct correlation between the release of ACh and behavioral recovery^{19, 32, 41}.

The former statements, together with the results presented here, suggest that in order to achieve behavioral recovery the levels of cortical ACh, as well as the properties of its release, should be similar to those in the control tissue, the differences in the levels of ACh in the fifth fraction post stimulation, between the 45 and 15 day transplants tissues which did not meet the control ACh levels are not capable of inducing functional recovery. In fact, the levels of ACh in heterotopic transplants are significantly below those in control group (Figure 2-B).

Several studies have examined receptor expression in neural transplants and their possible role in functional recovery induced by transplant after lesions^{10, 24, 26}. However, the relation between receptor expression and behavioral recovery is uncertain. The present results of receptor binding analysis showed significant differences for some competing drugs in the specific displacement binding to L-Glu receptors in the homotopic grafts (IC-45), in comparison with the intact IC. Furthermore, the binding analysis showed that the results in heterotopic grafts (OC-45) are similar to those in control tissue regarding the effects of the competing drugs used, which suggests that the role of L-Glu receptors in the grafts is not directly related to behavioral recovery. In this regard,

autoradiographic studies³⁵ have assessed the presence of dopamine and muscarine receptors in striatal transplants, or 5-HT₂ receptors in cortical transplants, regardless of the transplant location and surrounding environment. According to these findings it has been suggested that the expression of neurotransmitter receptors is determined by intrinsic properties of the transplanted tissue, and is independent of transplant location and environment. Similarly, it was suggested that the expression of neurotransmitter receptors might not be essential when associated with trophic mechanisms for functional recovery. Nevertheless, the receptors in the transplants may play an important role and they are necessary for synaptic signal transduction, when functional recovery requires neuroanatomical integration between the host brain and the grafted tissue³⁵.

The results of specific ligand binding of homotopic grafts shown here, are in keeping with previous results that showed the reduction of KCl stimulated [¹⁴C]L-Glu release in the homotopic graft as compared to IC control tissue³². The relative lack of receptor-binding displacement in homotopic grafts reported here, cannot be due to technical problems with the binding assay procedure, since binding to adjacent host tissue is apparent (see OLF-C in table 1). One possible explanation for these results, could be a reduction of thalamocortical glutamatergic projections into the grafts³⁹. Results in our laboratory¹⁸ have suggested a significant loss of afferent fibers from the thalamus after IC lesions, as well as a reduction in the connections between the host thalamus and IC grafts compared to intact structures, suggesting that the grafted tissue was unable to sustain feedback, required for maintaining normal levels of L-Glu receptors.

There are several indications that ACh, compared to other neurotransmitters (i.e L-Glu or GABA) is directly involved in the processes of behavioral recovery brought about by homotopic cortical transplants. It has been shown that lesions of the nucleus basalis magnocellularis, whose afferents provide the major part of ACh to the neocortex, disrupt CTA acquisition^{33, 43}. Moreover, IC possesses the enzymes required for the synthesis and degradation of ACh, as well as a strictly Ca²⁺ dependent mechanism of ACh release³². ACh levels obtained by *in vivo* analysis of free moving rats suggest that the proper learning of CTA (measured by liquid consumption) in the different experimental groups is highly correlated with the *in vivo* extracellular levels of ACh. The gradual recovery of the ACh

levels, after KCl stimulation, correlated with the efficiency of execution of the CTA.

In conclusion these results suggest that ACh, but not glutamate (glutamate receptors), is specifically involved in the processes of taste aversion learning recovery induced by homotopic cortical transplants.

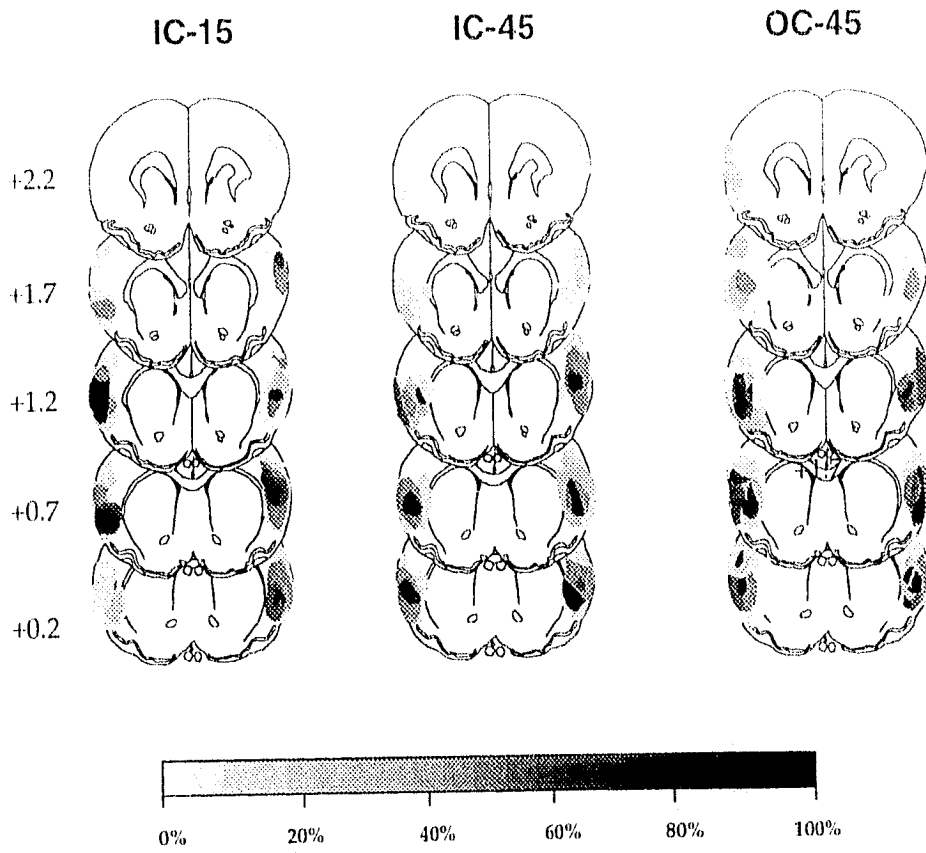
Figure 1: A. Schematic representations of sequences of brain coronal sections of transplanted of the IC. The schematic representation of the sections were adapted from Paxinos and Watson (1986). The camera lucida drawings of each transplanat were superimposed on the corresponding section together with all transplant drawings of its group. The gray scale on the bottom represents the percentage of transplants that were coincident, as more darker, more coincident transplants. Homotopic 15 days post graft, IC-15; homotopic 45 days post-graft, IC-45; and heterotopic 45 days post-graft, OC-45. B. Photomicrographs of cresyl violett stainings of representative lesions of each group; scale bars at the bottom left of each square, 2mm.

Figure 2: A. Percentage of baseline intake of NaCl consumed by the control (n=12), IC-15 days post-graft (n=7), IC-45 days post-graft (n=21) and OC-45 days post-graft (n=18). Left panel shows the results from one taste trial prior to implant (lesioned groups). Right panel shows the results of one taste trial after implant. Values are means \pm SEM **p<.001. B. Extracellular levels of ACh in the insular cortex after stimulation with 56 mM KCl. ACh is expressed as the percentage of the three first samples. Mean average of the three first samples collected: Control= 230.62 nmol/30 μ l, (filled circles n=8); homotopic transplants 45 days post-graft= 205.79 nmol/30 μ l, (open circles, n=6); homotopic transplants 15 days post-graft=161.05 nmol/30 μ l, (shaded triangles, n=7); and heteropic transplants 45 days post-graft=307.71 nmol/30 μ l, (blank squares, n=4). (means \pm S.E.M.) **p<0.02 with controls; && p<0.02 with IC-45. C. Analysis of the correlation between the volume of NaCl (0.15m) ingested during the CTA test and the extracellular levels of ACh (nmol/30 μ l) of each of the animals analyzed, during the fifth fraction of free movement microdialysis. the correlation showed significance (P<.006) between the distribution of the the different groups, indicating that a lesser extracellular concentraion of ACh was observed with increased consumption during the aversion test. Control, filled circles; homotopic transplants 45 days post-graft, open circles; homotopic transplants 15 days post-graft, shaded triangles; and heteropic transplants 45 days post-graft, blank squares.

	Agonists					Antagonists		
	L-Glu	AMPA	KA	NMDA	t-ACPD	DNQX	CPP	MK801
CON	0.234±06	0.212±07	0.205±06	0.208±06	0.214±07	0.196±07	0.205±07	0.202±06
LESION	0.029±01*	-0.023±04**	0.019±01*	0.017±01*	0.011±01*	0.020±01*	0.008±01*	0.013±01*
IC-45	0.151±03	0.068±01*	0.104±02*	0.100±05*	0.123±02	0.099±02	0.076±03*	0.112±03
OC-45	0.133±07	0.157±06	0.146±07	0.188±07	0.162±08	0.130±07	0.112±06	0.082±07
OLF-C	0.488±05**	0.264±01	0.232±03	0.158±01	0.332±04	0.241±01	0.213±03	0.274±03

Table 1: SPECIFIC DISPLACEMENT OF [³H]L-Glu BINDING IN CONTROL AND GRAFTED ANIMALS (data expressed in pmol/mg protein). Results are expressed as specific displacement by a drug concentration of 1 mM for L-Glu and t-ACPD, 100 μM for MK801, and 200 μM for all others. NMDA was tried in the presence of 300 μM glycine. 1 mM MCPG was tried and showed no effect. 50 to 60 μg of membrane protein was used in all groups. Control was intact insular cortex (CON, n=11), insular cortex 45 days post-graft (IC-45, n=12), occipital cortex 45 days post-graft (OC-45, n=10), intact olfactory cortex (OLF-C, n=8) and lesion groups (n=8). Values are mean ± SEM. **p<.01, *p<.05 as compared to the controls (Fisher's PLSD test).

A.



B.



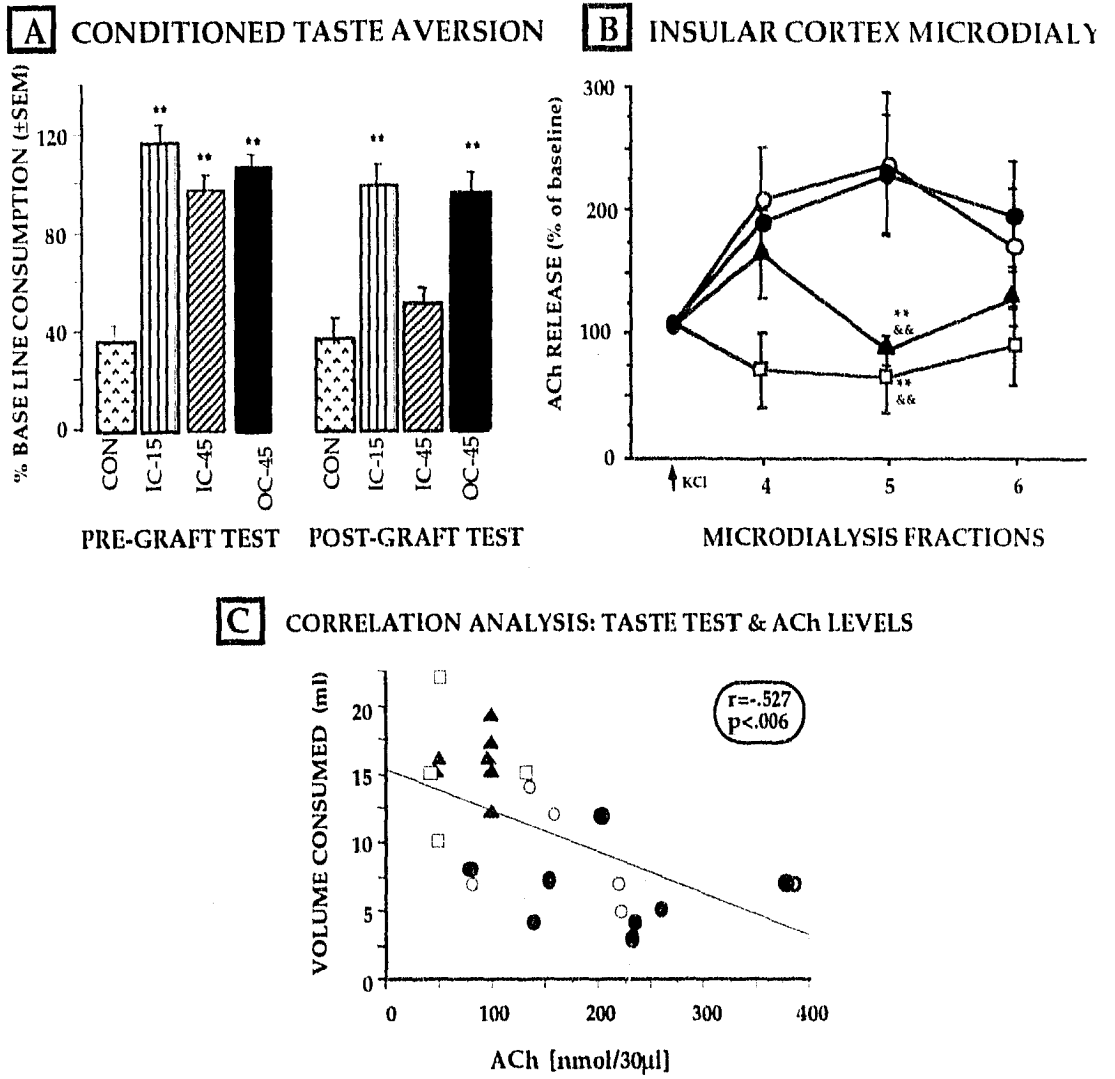


Figure 2.

- 1 Bartus, R. T., Dean R. L., Beer B. and Lippa A. S., The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, *Science*, 217 408-417, 1982.
- 2 Bermúdez-Rattoni, F., Fernández J., Sánchez M. A., Aguilar-Roblero R. and Drucker-Colin R., Fetal brain transplants induce recuperation of taste aversion learning, *Brain Research*, 416 147-152, 1987.
- 3 Björklund, A., Lindvall O., Isacson O., Brundin P., Wictorin K., Strecker R. E., Clarke D. J. and Dunnet S. B., Mechanisms of action of intracerebral neural implants. Studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum, *Trends in Neuroscience*, 12 509-516, 1987.
- 4 Björklund, A., Schmidt R. H. and Stenevi U., Functional reinnervation of the neostriatum in the rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra, *Cell Tissue Research*, 212 39-45, 1980.
- 5 Björklund, A. and Stenevi U., Intracerebral neural implants: Neural replacement and reconstruction of damage circuitries, *Annual Review of Neuroscience*, 7 279-308, 1984.
- 6 Brown, J. J., Lasiter P. S. and Kiefer S. W., The gustatory neocortex of the rat, *Physiol. Psychol.*, 10 13-45, 1982.
- 7 Collerton, D., Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease, *Neuroscience*, 19 1-28, 1986.
- 8 Collingridge, G. L. and Singer W., Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity, *Trends Pharmac. Sci.*, 11 90-96, 1990.
- 9 Danysz, W., Wroblewski J. T. and Costa E., Learning impairment in rats by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists, *Neuropharmacology*, 27 653-656, 1988.
- 10 Das, G. D., Neural transplantation in mammalian brain: some conceptual and technical considerations. In R. B. Wallace and G. D. Das (Eds.), *Neural Tissue Transplantation Research*, Springer-Verlag, New York, pp. 1-64, 1983.
- 11 Davis, M., Rainnie D. and Cassell M., Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety, *Trends in Neural Science*, 17 208-214, 1994.
- 12 Decker, M. W. and McGaugh J. L., The role of interactions between the cholinergic and other neuromodulatory system in learning and memory, *Synapse*, 7 151-168, 1991.
- 13 Dekker, A. J. and Thal L. J., Independent effects of cholinergic and serotonergic lesions on acetylcholine and serotonin release in the cortex of the rat, *Neurochem. Res.*, 18 277-283, 1993.
- 14 Dubois, B., Mayo W., Agid Y., Le Moal M. and Simon H., Profound disturbances of spontaneous and learned behaviors following lesions of the nucleus basalis magnocellularis in the rat, *Brain Research*, 338 249-258, 1985.
- 15 Dunnett, S. B. and al e., Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of the rats with lesions of nucleus basalis magnocellularis- II. Sensorimotor and learning impairments, *Neuroscience*, 16 787-797, 1985.

- 16 Dunnett, S. B. and Bjorklund A., Mechanisms of function of neural grafts in the adult mammalian brain, *Journal of Experimental Biology*, 132 256-289, 1987.
- 17 Dunnett, S. B., Low W. C., Iversen J. D., Stenevi U. and Bjorklund A., Septal transplants restore maze learning in rats with fornix-fimbria lesions, *Brain Research*, 251 335-348, 1982.
- 18 Escobar, M., Fernández J., Guevara-Aguilar R. and Bermúdez-Rattoni F., Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion, *Brain Research*, 478 368-374, 1989.
- 19 Escobar, M. L., Jiménez N., López-García J. C., Tapia R. and Bermúdez-Rattoni F., Nerve growth factor with insular cortical grafts induces recovery of learning and reestablishes graft choline acetyltransferase activity, *Journal of Neural Transplantation and Plasticity*, 4 167-172, 1993.
- 20 Fernández-Ruiz, J., Escobar M. L., Piña A. L., Diaz-Cintra S., Cintra-McGlone F. L. and Bermúdez-Rattoni F., Time-dependent recovery of taste aversion learning by fetal brain transplants in gustatory neocortex-lesioned rats, *Behavioral and Neural Biology*, 55 179-193, 1991.
- 21 Fine, A., Dunnett S. B., Bjorklund A., Clark D. J. and Iversen S. D., Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of rats with lesions of nucleus basalis magnocellularis-1. Biochemical and anatomical observations, *Neuroscience*, 16 769-786, 1985.
- 22 Fricke, V., A new scintillation cocktail based on triton-X-100, *Anal. Biochem.*, 63 555-558, 1975.
- 23 Gage, F. H. and Bjorklund A., Cholinergic septal grafts into the hippocampal formation improve spatial learning and memory in aged rats by an atropine-sensitive mechanism, *J. Neurosci.*, 6 2837-2847, 1986.
- 24 Graybiel, A. M., Liu F. C. and S.B. D., Intrastratial grafts derived from fetal striatal primordia. I. Phenotypy and modular organization, *Journal of Neuroscience*, 9 3250-3275, 1989.
- 25 Hepler, D. J., Wenk G. L., Cribbs B. L., Olton D. S. and Coyle J. T., Memory impairments following basal forebrain lesions, *Brain Research*, 346 8-14, 1985.
- 26 Isacson, O., Dawbarn D., Brundin P., Gage F. H., Emson P. C. and Bjorklund A., Neural grafting in a rat model of Huntington's disease: striosomal-like organization of striatal grafts as revealed by acetylcholinesterase histochemistry, immunocytochemistry and receptor autoradiography, *Neuroscience*, 22 481-497, 1987.
- 27 Jaeger, C. B. and Lund R. D., Transplantation of embryonic occipital cortex to the tectal region of newborn rats: A light microscopic study of organization and connectivity of the transplants, *Journal of Comparative Neurology*, 194 571-597, 1980.
- 28 Kiefer, S. W., Neural Mediation of Conditioning Food Aversions, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 443 100-109, 1985.

- 29 Kim, M. and McGaugh J. L., Effects of intra amygdala injections of NMDA receptors antagonists on acquisition and retention of inhibitory avoidance, *Brain Research*, 585 35-48, 1992.
- 30 Lasiter, P. S. and Glanzman D. L., Cortical substrates of taste aversion learning: Involvement of the dorsolateral amygdaloid nuclei and the temporal neocortex in taste aversion learning, *Behavioral Neuroscience*, 99 257-276, 1985.
- 31 López-Colomé, A. M. and Somohano F., Localization of L-glutamate and L-aspartate synaptic receptors in chick retinal neurons, *Brain Research*, 298 159-162, 1984.
- 32 López-García, J. C., Fernández-Ruiz J., Bermúdez-Rattoni F. and Tapia R., Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts, *Brain Research*, 523 105-110, 1990.
- 33 López-García, J. C., Fernández-Ruiz J., Escobar M. L., Bermúdez-Rattoni F. and Tapia R., 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, 1993.
- 34 Lowry, O. H., Rosebroug W. J., Farr A. L. and Randall R. S., Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 265-275, 1951.
- 35 Lu, S. Y. and Norman A. B., Neurotransmitter receptors in fetal tissue transplants: Expression and functional significance, *Journal of neural transplantation & plasticity*, 4 215-226, 1993.
- 36 Mandel, R. J., Gage F. H. and Thal L. J., Enhanced detection of nucleus basalis magnocellularis lesion-induced spatial learning deficit in rats by modification of training regimen, *Behav. Brain Res.*, 31 221-229, 1989.
- 37 Murray, C. L. and Fibiger H. C., Learning and memory deficits after lesions of the nucleus basalis magnocellularis: Reversal by physostigmine, *Neuroscience*, 14 1025-1032, 1985.
- 38 Nilsson, O. G., Shapiro M. L., Gage F. H., Olton D. S. and Björklund A., Spatial learning and memory following fimbria-fornix transection and grafting of fetal septal neurons to the hippocampus, *Expl. Brain. Res.*, 67 195-215, 1987.
- 39 Oka, J. I., Metherate R. S. and Hicks T. P., Excitatory amino acid antagonists and synaptic transmission in the cat's intact thalamo-cortical somatosensory pathway. In T. P. Hicks, D. Lodge and H. McLennan (Eds.), *Excitatory amino acid transmission*, New York, pp. 401-404, 1987.
- 40 Page, K. J., Everitt B. J., Robbins T. W., Marston H. M. and Wilkinson L. S., Dissociable effects on spatial maze and passive avoidance acquisition and retention following AMPA and ibotenic acid-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain in rats: differential dependence on cholinergic neuronal loss, *Neuroscience*, 43 412-472, 1991.
- 41 Russell, R. W., Escobar M. L., Booth R. A. and Bermúdez-Rattoni F., Accelerating behavioral recovery after cortical lesions: II. in vivo evidence for cholinergic involvement, *Behavioral and Neural Biology*, 61 81-92, 1994.

42 Smith, G., Animal model of Alzheimer's disease: Experimental cholinergic denervation, *Brain Res. Rev.*, 13 103-118, 1988.

43 Tardif, R., Kesner R. P. and Berman R. F., Nucleus basalis magnocellularis is involved in taste aversion learning rats, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 14 1226, 1988.

44 Whitehouse, P. J., Price D. L., Struble R., Clarke A. W., Coyle J. T. and DeLong M. R., Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain, *Science*, 215 1237-1239, 1982.

Conclusiones Generales



Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis pueden ser analizados estableciendo una correlación entre los niveles colinérgicos y las características de integración de los trasplantes corticales con las mejorías proporcionadas por éstos. De esta forma, los trasplantes pueden aportar información sobre la hipótesis colinérgica del aprendizaje y la memoria en los procesos de recuperación.

El estudio de los procesos de la recuperación conductual mediada por trasplantes enfrenta un problema que involucra no sólo un sistema de neurotransmisión, en particular al sistema colinérgico, el cual pudiera estar interactuando, modulando y/o siendo modulado por otros sistemas; también pudiera tratarse de un fenómeno no enteramente cortical y en algunos aspectos, no cognoscitivo por naturaleza (p.e. la integración del trasplante). Asimismo, las áreas cerebrales involucradas, los mecanismos neurales, los paradigmas utilizados, etc., son ejemplos de las variables a considerar. Por tal motivo trataré de concluir proponiendo un mecanismo que concilie la recuperación funcional mediada por trasplantes con las teorías cognoscitivas.

Mucho se ha especulado sobre cuáles son los factores necesarios para la supervivencia de un trasplante. Como mencioné en el marco teórico el consenso está dado para la edad del tejido (deberá ser embrionario), el límite de tiempo durante el desarrollo para obtener el tejido a ser transplantado (variable para cada tipo neuronal) y la selección del sitio del trasplante en el huésped. Los mecanismos por los cuales estos injertos se vuelven viables y llegan en muchas ocasiones a proporcionar mejorías también ha logrado consensos en la literatura. Entre lo más sobresaliente es la idea de funcionar como bombas que proporcionan neurotransmisores y/o factores tróficos ausentes en el huésped¹¹; quedando varias incógnitas por resolver, como la necesaria reconectividad entre el trasplante y el tejido huésped^{32, 90}.

Integración y reconectividad de transplantes en CI

En el caso particular de los transplantes fetales colocados en la corteza insular han presentado una buena integración que se ha determinado por las características celulares (supervivencia y madurez), así como cierta reconectividad del tejido transplantado, en particular con el núcleo ventromedial del tálamo (NVT) y con la amígdala del huésped³⁸. A su vez, también se han descrito diferencias de conectividad entre los injertos realizados con tejido fetal homotópico y heterotópico; la reconectividad fue prácticamente inexistente en los injertos heterotópicos.

El establecimiento de nuevas conexiones entre la CI y el NVT o la amígdala, escasas a comparación de las observadas en el tejido intacto, podría estar mediado por factores tróficos; los transplantes por sí solos y el tejido huésped lesionado-denervado podrían ser las dos fuentes principales de estos factores. Una posible hipótesis que se ha planteado, para explicar los efectos de los transplantes dentro del modelo utilizado en nuestro laboratorio, se basa en que la reconectividad entre la CI y el NVT puede parar el proceso de degeneración provocado por la lesión y el trasplante y, por otra parte, ayudar a mejorar (reemplazar) la función perdida³⁸.

En contraste, los resultados de unión a ligandos del receptor a L-Glu encontrados en este trabajo, y los obtenidos en rebanadas con medición de liberación de L-Glu marcado radioactivamente⁶², podrían sugerir una ineficiente reconectividad con las regiones talámicas, cuyas proyecciones se cree en su mayoría son glutamatérgicas⁷⁸.

Arreglo citoarquitectónico

Por otra parte, en los estudios realizados durante esta tesis, así como en otros trabajos^{6, 36, 69, 110}, el análisis morfológico grueso (e.g. tinción de Nissl) de los injertos realizados en CI que promueven recuperación conductual, reveló un acomodo citoarquitectónico irregular que no sigue el arreglo laminar claramente visible en la CI intacta. Esto sugiere que a pesar de que el tejido transplantado mantiene su propio patrón de desarrollo y maduración neuronal, es capaz de lograr una mejoría funcional. Sin embargo, esto no quiere decir que en todos los casos se pierda el arreglo laminar; Castro y colaboradores²⁰ encontraron que transplantes

fetales corticales en el hemisferio cerebral de ratas recién nacidas, mostraron un patrón laminar similar a la distribución cortical normal en las capas supra e infragranular, debido a que el factor de laminación neocortical aparece durante el desarrollo postnatal.

Transplantes en la recuperación de la adquisición del CAS

Los resultados de los diversos experimentos que hasta ahora se han realizado con transplantes fetales en la corteza insular, permiten concluir lo siguiente:

- Los transplantes fetales homotópicos son los únicos capaces de promover una franca recuperación del aprendizaje (adquisición) del CAS⁶.
- Estos injertos necesitan un período de por lo menos 45 días postransplante para poder promover el aprendizaje de la respuesta aversiva³⁶.
- A los treinta días postransplante las neuronas del transplante empiezan a establecer conexiones con el tálamo y la amígdala del huésped³⁶.
- Las neuronas del transplante presentan reactividad a colinesterasa en forma tiempo-dependiente con alta correlación con la recuperación funcional³⁶.
- Las neuronas en los transplantes de 60 días (que facilitan significativamente la recuperación conductual) presentan mayor madurez morfológica que las neuronas de los transplantes más jóvenes³⁸.
- La recuperación conductual es acelerada de 60 a 15 días, cuando los transplantes son acompañados por NGF³⁷.

fetales corticales en el hemisferio cerebral de ratas recién nacidas, mostraron un patrón laminar similar a la distribución cortical normal en las capas supra e infragranular, debido a que el factor de laminación neocortical aparece durante el desarrollo postnatal.

Transplantes en la recuperación de la adquisición del CAS

Los resultados de los diversos experimentos que hasta ahora se han realizado con transplantes fetales en la corteza insular, permiten concluir lo siguiente:

- Los transplantes fetales homotópicos son los únicos capaces de promover una franca recuperación del aprendizaje (adquisición) del CAS⁶.
- Estos injertos necesitan un período de por lo menos 45 días postransplante para poder promover el aprendizaje de la respuesta aversiva³⁸.
- A los treinta días postransplante las neuronas del transplante empiezan a establecer conexiones con el tálamo y la amígdala del huésped³⁶.
- Las neuronas del transplante presentan reactividad a colinesterasa en forma tiempo-dependiente con alta correlación con la recuperación funcional³⁶.
- Las neuronas en los transplantes de 60 días (que facilitan significativamente la recuperación conductual) presentan mayor madurez morfológica que las neuronas de los transplantes más jóvenes³⁸.
- La recuperación conductual es acelerada de 60 a 15 días, cuando los transplantes son acompañados por NGF³⁷.

Transplantes en la recuperación de la memoria del CAS

Estas conclusiones han sido ampliadas con otros trabajos⁸⁰, que sorpresivamente mostraron que los transplantes homotópicos y heterotópicos pueden recuperar el recuerdo de las aversiones aprendidas antes de la lesión, es decir la memoria de dicho suceso. Además comprobaron que los transplantes homotópicos adicionados con NGF, además de acelerar a 15 días la capacidad de recuperación de un nuevo aprendizaje del CAS, también inducen el recuerdo del condicionamiento aprendido antes de la lesión.

Transplantes corticales adicionados con NGF

Dentro de los propósitos iniciales de esta tesis, intentamos replicar los resultados previamente publicados³⁷ sobre la aceleración de la recuperación conductual mediada por transplantes adicionados con NGF en la CI, para poder cuantificar *in vivo* el contenido de ACh en dichos transplantes. Los experimentos fueron diseñados bajo las mismas condiciones variando sólo la metodología de lesión*, la cual consistió en la inyección intracortical del agonista NMDA al receptor a glutamato que provocó una lesión excitotóxica que eliminó sólo a los cuerpos celulares sin dañar mayormente las vías de paso.

Dichos experimentos conductuales con transplantes adicionados con NGF en la CI realizados en el inicio de esta tesis, no reprodujeron los efectos de aceleración encontrados³⁷, ni tampoco pudieron promover la recuperación a mayor tiempo (45 días). Asimismo, el análisis *in vivo* de ACh extracelular de estos transplantes presentó severas contradicciones con los reportes previos obtenidos con lesiones electrolíticas³⁷.

Las diferencias en los resultados obtenidos en animales lesionados con NMDA a comparación con los lesionados electrolíticamente (ambos posteriormente transplantados con tejido homotópico adicionado con NGF), sugieren que dichas técnicas de lesión no pueden considerarse como una metodología similar o intercambiable. Los efectos provocados por las lesiones electrolíticas, como la pérdida considerable de células y procesos que dejan un espacio claramente visible, podrían reflejar cambios de naturaleza distinta a los presentes en el tejido lesionado con NMDA.

*Todos los reportes anteriores utilizaron lesiones electrolíticas, excepto para los trabajos de Ormsby et al. que discutiré posteriormente.

Existen muchos ejemplos de investigaciones sobre lesiones con efectos diferenciales dependiendo de la neurotoxina utilizada^{34, 65, 95}, que sugieren que el SNC es altamente sensible y responde de manera particular dependiendo del tratamiento utilizado.

Desafortunadamente, para poder aclarar los efectos de lesiones electrolíticas vs excitotóxicas, es necesario realizar trabajos enfocados exclusivamente a este problema, y que por razones obvias quedaron fuera de los objetivos de esta tesis. Por el mismo motivo el proyecto, que en sus inicios fue planteado para estudiar los trasplantes con NGF, tuvo que reenfocarse a estudiar los efectos de los trasplantes sin adición del factor, los cuales sí promovieron la recuperación funcional a partir de los 45 días postransplante.

ACh extracelular en trasplantes: mediciones *in vivo*

Los resultados obtenidos a través de microdiálisis *in vivo* confirman de manera directa, la participación del sistema colinérgico en la recuperación conductual mediada por trasplantes homotópicos corticales, ya que la respuesta de liberación *in vivo* de ACh cortical está altamente correlacionada con la adquisición de la conducta aversiva (figura 2-C en resultados).

Los niveles de ACh del grupo de trasplantes homotópicos de 15 días postransplante sugieren que a pesar de presentar en las primeras 3 fracciones cantidades similares de ACh extracelular y de responder a la estimulación con alto potasio al igual que el tejido intacto, al menos en la primera fracción después del estímulo, (presentando un decaimiento significativo hasta la 2a fracción postestimulación) no promueven aún la recuperación conductual (figura 2-B). Para el caso de los trasplantes heterotópicos, que tampoco promovieron la recuperación del aprendizaje del CAS, presentaron niveles de ACh en las primeras fracciones basales similares a los del control; sin embargo, la respuesta a la estimulación con KCl en las 2 posteriores fracciones fue significativamente menor a la observada en el tejido control. Esto podría indicar que el avance gradual en la liberación *in vivo* de ACh no implica una carencia absoluta de ACh; siendo quizás la capacidad de respuesta del tejido la que promueva, entre otras, la recuperación funcional.

Contradictoriamente, los niveles extracelulares de ACh en el grupo de ratas lesionadas no presentaron diferencias significativas con los niveles control y se obtuvo una respuesta de liberación similar. Estos

resultados podrían explicarse al tomar en cuenta que la lesión con NMDA es relativamente reducida y no deja un espacio vacío, reflejándose en los niveles extracelulares de ACh durante la perfusión por microdiálisis; durante el muestreo la sonda pudo abarcar una región más amplia de tejido que la ocasionada por la lesión, no siendo el caso para los trasplantes debido al crecimiento que tienen éstos dentro de la corteza, lo que permitió cubrir casi totalmente al tejido transplantado (figura 6).

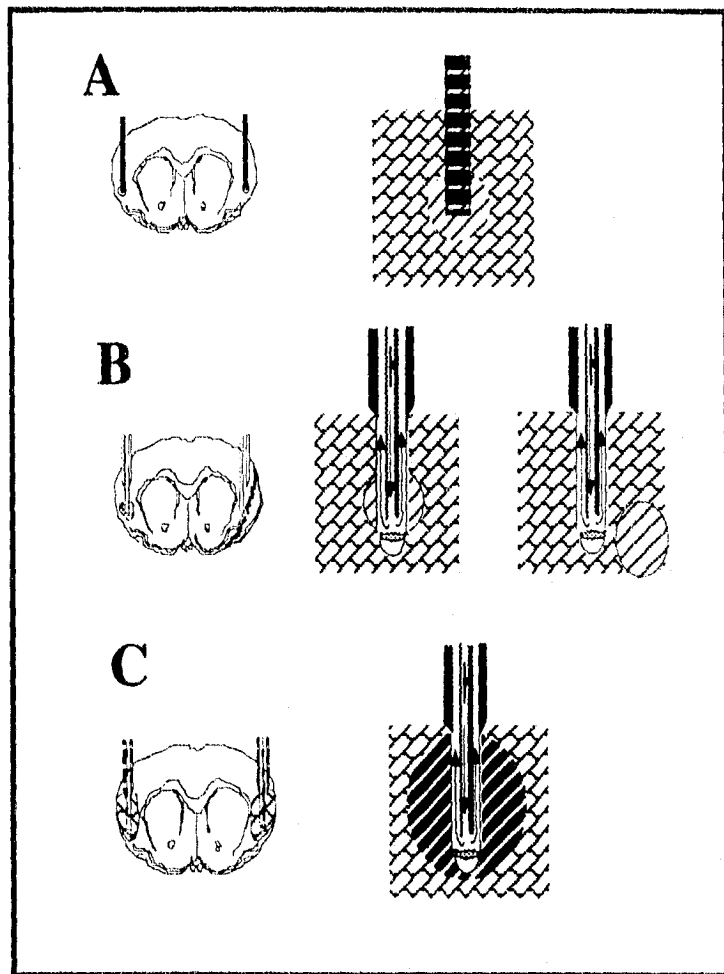


Figura 6. A. Esquema de la probable localización de la lesión provocada por NMDA, la cual destruye los cuerpos celulares y sólo deja las fibras de paso. B. La lesión pudo haber afectado un área menor o haberse desplazado del área ocupada por la sonda de microdiálisis. C. La sonda de microdiálisis ocupó por completo el área del tejido transplantado.

Así mismo, la posibilidad de liberación de ACh de las aferencias colinérgicas aún intactas dentro de la corteza lesionada (ya que las lesiones con NMDA no destruyen las vías de paso), también podría explicar en parte los resultados obtenidos.

Actividad moduladora de la ACh cortical

Por otra parte, las afirmaciones hechas por Björklund y Dunnet¹⁴ basadas en el experimento de Winkler *et al.*,¹⁰⁴ en el que transplantaron fibroblastos genéticamente manipulados para liberar constitutivamente ACh en la corteza fronto-parietal, sugirieron que el suplemento cortical local de ACh a la corteza denervada, es suficiente para promover significativamente la recuperación conductual en el aprendizaje del laberinto de agua. Esto indica que la liberación de ACh sinápticamente regulada (impulso-dependiente) puede no ser necesaria para la inducción de la recuperación funcional.

Estos hallazgos concuerdan con las propuestas de los mecanismos de regulación colinérgica subcortical, sugiriendo que los circuitos corticales pueden depender de la acción colinérgica difusa para mantener sus funciones básicas, en lugar de la liberación de las conexiones neurales aferentes.

Retomando las anteriores afirmaciones, los resultados del presente trabajo podrían indicar que es necesaria una cantidad mínima de ACh cortical para poder promover algunos de los diferentes sucesos que desencadenan la recuperación funcional lograda sólo a través de la transplantación de tejido fetal proveniente de la misma región. Es decir, los trasplantes además de ser homotópicos, deberán poseer las mismas características de liberación (e.g. diferencias en los niveles de ACh de la 2a fracción postestimulación entre los trasplantes homotópicos de 15 y 45 días). Una de las probables causas que imposibilita promover la recuperación funcional al tejido heterotópico transplantado, es la de no poder liberar de manera adecuada la ACh, a pesar de que en su estado basal (sin estimulación alguna) no presenta diferencias en los niveles extracelulares de ACh con respecto al tejido intacto, p.e. los niveles de ACh de los trasplantes heterotópicos se mantienen significativamente debajo de los del tejido control después de la estimulación con KCl.

Las anteriores afirmaciones sugieren que no sólo concentraciones basales de ACh extracelular son suficientes para correlacionarse con la recuperación funcional, al parecer sólo el tejido homotópico después de un tiempo mayor a los 45 días, permite que el comportamiento de liberación de ACh se parezca al observado en el tejido intacto. Por tal motivo, la teoría de que el trasplante podría funcionar como una bomba de neurotransmisores o factores queda aún por comprobarse en este modelo. Probablemente los mecanismos que logran la recuperación funcional podrían explicarse a través del sistema propuesto de *punte activo*⁴², donde el trasplante esta otorgando un sustrato citoarquitectónico capaz de promover una adecuada liberación y probablemente, una reconectividad con regiones involucradas en el desempeño de la función perdida por la lesión.

La ACh en el modelo de recuperación del CAS mediado por trasplantes homotópicos, podría ser el reflejo del restablecimiento de este *punte activo* promovido por las células provenientes de la CI fetal, que logran después de un tiempo establecido igualar ciertas condiciones, entre ellas las características de liberación del neurotransmisor ACh.

La comparación de las concentraciones extracelulares de ACh entre los trasplantes homotópicos y heterotópicos después de la estimulación con KCl, sugiere la necesidad de que existan niveles colinérgicos óptimos en la CI para el buen desempeño del CAS. De la misma forma, los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio⁶³ con lesiones del NBM que impiden la adquisición del CAS, así como los recientes hallazgos de que la disminución colinérgica provocada por anticuerpos anti-NGF en la CI, impiden la adquisición pero no la evocación de la aversión gustativa. Indican que probablemente el suministro colinérgico tiene un papel relevante en el aprendizaje del CAS. Asimismo estos datos podrían indicar que la CI no es el centro de almacenamiento de la información y que el recuerdo de las aversiones al sabor (memoria) es independiente de la transmisión colinérgica.

Al respecto, se tendrán que realizar nuevos experimentos diseñados para obtener datos más directos sobre la participación exclusiva del sistema colinérgico, de tal modo que los trasplantes de tejido fetal quizás deberán dejarse a un lado por presentar una serie de variables que, además de no poderse controlar, en muchos casos no se han identificado. Aún así, los trasplantes han dejado una serie de evidencias muy útiles que están abriendo nuevas perspectivas en el estudio de la conducta, la recuperación y la bioquímica del SNC.

Referencias



- 1 Abdulla, F. A., Abu-Bakra M. A. J., Calamicini M. R., Stephenson J. D. and Sinden J. D., Importance of forebrain cholinergic and GABAergic systems to the age-related deficits in water maze performance of rats, *Neurobiology of Aging*, 16 41-52, 1995.
- 2 Arendt, T., Allen Y., Marchbanks R., Schugens M. M., Sinden J., Lantos P. L. and Gray J. A., 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, 1989.
- 3 Arendt, T., Bigl V., Arendt A. and Tennstedt A., Loss of neurons in the nucleus basalis of Maynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's disease, *Acta Neuropathologica*, 61 101-108, 1983.
- 4 Åstrom, K. E., On the central course of afferent fibers in the trigeminal, facial, glossopharyngeal, and vagal nerves and their nuclei in the mouse, *Acta Physiol. Scand*, 29 309-320, 1953.
- 5 Benjamin, R. M. and Pfaffman C., Cortical localization of taste in the albino rat, *Journal of Neurophysiology*, 18 56-64, 1955.
- 6 Bermúdez-Rattoni, F., Fernández J., Sánchez M. A., Aguilar-Roblero R. and Drucker-Colín R., Fetal brain transplants induce recuperation of taste aversion learning, *Brain Research*, 416 147-152, 1987.
- 7 Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collinson I. B. and McGaugh J. L., 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, 1991.
- 8 Bermúdez-Rattoni, F. and McGaugh J. L., Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioning taste aversion, *Brain Research*, 49 165-170, 1991.
- 9 Björklund, A. and Dunnett S. B., Acetylcholine revisited, *Nature*, 375 446, 1995.

- 10 Björklund, A., Lindvall O., Isacson O., Brundin P., Wictorin K., Strecker R. E., Clarke D. J. and Dunnet S. B., Mechanisms of action of intracerebral neural implants. Studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum, *Trends in Neuroscience*, 12 509-516, 1987.
- 11 Björklund, A., Schmidt R. H. and Stenevi U., Functional reinnervation of the neostriatum in the rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra, *Cell Tissue Research*, 212 39-45, 1980.
- 12 Björklund, A., Segal M. and Stenevi U., Functional reinnervation of rat hippocampus by locus ceruleus implants, *Brain Research*, 170 409-426, 1979.
- 13 Björklund, A. and Stenevi U., Intracerebral neural implants: Neural replacement and reconstruction of damaged circuitries, *Annual Review of Neuroscience*, 7 279-308, 1984.
- 14 Björklund, A. and Stenevi U., *Neural Grafting in the Mammalian Central Nervous System*, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- 15 Braun, J. J. and Kiefer S. W., Preference-aversion functions for the basic taste stimuli in rats lacking gustatory neocortex, *Bulletin of the Psychonomic Society*, 6 438-439, 1975.
- 16 Braun, J. J., Lasiter P. S. and Kiefer S. W., The gustatory neocortex of the rat, *Physiological Psychology*, 10 13-45, 1982.
- 17 Braun, J. J., Slick T. B. and Lorden J. F., Involvement of gustatory neocortex in the learning of taste aversions, *Physiology and Behavior*, 9 637-641, 1972.
- 18 Bronzetti, E., Caporali M. G., Felici L., Niglio T., Scotti-de-Carolis A. and Amenta F., Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the rat frontoparietal cortex after ipsilateral lesions of the nucleus mesencephalicus profundus, *Pharmacology*, 46 301-307, 1993.
- 19 Butcher, L. L., Oh J. D., Woolf N. J., Edwards R. H. and Roghani A., Organization of central cholinergic neurons revealed by combined in situ hybridization histochemistry and choline-O-acetyltransferase immunocytochemistry, *Neurochemical International*, 21 429-445, 1992.
- 20 Castro, A. J., Tonder N., Sunde N. A. and Zimmer J., Fetal cortical transplants in the cerebral hemisphere of newborn rats: A retrograde fluorescent analysis of connections, *Experimental Brain Research*, 66 533-542, 1987.
- 21 Clarke, D. J. and Dunnet S. B., Ultrastructural organization of choline acetyltransferase immunoreactive fibres innervating the neocortex from embryonic ventral forebrain grafts, *J. Comp. Neurol.*, 250 192-205, 1986.

- 22 Collingridge, G. L. and Singer W., Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity, *Trends Pharmac. Sci.*, 11 90-96, 1990.
- 23 Cotman, C. W. and Kesslak P., The role of trophic factors in behavioral recovery and integration of transplants, *Progress in Brain Research*, 78 311-319, 1981.
- 24 Cotman, C. W. and Nieto-Sampedro M., Cell biology of synaptic plasticity, *science*, 225 1287-1294, 1984.
- 25 Chapman, P. F., Kairiss E. W., Keenan C. L. and Brown T. H., Long-term synaptic potentiation in the amygdala, *Synapse*, 6 271-278, 1990.
- 26 Danysz, W. and Wroblewski J. T., Amnesic properties of glutamate receptor antagonists, *Neurosci. Res. Commun.*, 5 9-18, 1989.
- 27 Dekker, A. J. and Thal L. J., Independent effects of cholinergic and serotonergic lesions on acetylcholine and serotonin release in the cortex of the rat, *Neurochem. Res.*, 18 277-283, 1993.
- 28 Deutsch, J. A., The cholinergic synapse and the site of memory, *Science*, 174 788-794, 1971.
- 29 Divac, I., Gade A. and Wikmark R. E. G., Taste aversion in rats with lesions in the frontal lobes. No evidence for interoceptive agnosia, *Physiological Psychology*, 3 43-46, 1975.
- 30 Dunn, L. T. and Everit B. J., Double dissociation of the effect of amygdala and insular cortex lesions on conditioning taste aversion, passive avoidance, and neophobia in rat using the excitotoxin ibotenic acid, *Behavioral Neuroscience*, 102 3-23, 1988.
- 31 Dunnett, S. B. and al e., Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of the rats with lesions of nucleus basalis magnocellularis- II. Sensorimotor and learning impairments, *Neuroscience*, 16 787-797, 1985.
- 32 Dunnett, S. B. and Bjorklund A., Mechanisms of function of neural grafts in the adult mammalian brain, *Journal of Experimental Biology*, 132 256-289, 1987.
- 33 Dunnett, S. B., O I., Sirinathsinghji D. J. S., Clarke D. J. and Björklund A., Striatal lesions in the the ibotenic acid-lesioned neostriatum: Functional studies, *Progress in Brain Research*, 78 39-45, 1988.

- 34 Dunnett, S. B., Whishaw I. Q. and Jones G. H., Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acid injected into nucleus basalis magnocellularis of rats, *Neuroscience*, 20 653-669, 1987.
- 35 Durán-Arevalo, M., Cruz-Morales S. E. and Prado-Alcalá R. A., Is acetylcholine involved in memory consolidation of over reinforced learning ?, *Brain Research Bulletin*, 24 725-727, 1990.
- 36 Escobar, M., Fernández J., Guevara-Aguilar R. and Bermúdez-Rattoni F., Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion, *Brain Research*, 478 368-374, 1989.
- 37 Escobar, M. L., Jiménez N., López-García J. C., Tapia R. and Bermúdez-Rattoni F., Nerve growth factor with insular cortical grafts induces recovery of learning and reestablishes graft choline acetyltransferase activity, *Journal of Neural Transplantation and Plasticity*, 4 167-172, 1993.
- 38 Fernández-Ruiz, J., Escobar M. L., Piña A. L., Díaz-Cintra S., Cintra-McGlone F. L. and Bermúdez-Rattoni F., Time-dependent recovery of taste aversion learning by fetal brain transplants in gustatory neocortex-lesioned rats, *Behavioral and Neural Biology*, 55 179-193, 1991.
- 39 Fine, A., Dunnet S. B., Björklund A., Clark D. J. and Iversen S. D., Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of rats with lesions of nucleus basalis magnocellularis-1. Biochemical and anatomical observations, *Neuroscience*, 16 769-786, 1985.
- 40 Frotscher, M. and Naumann T., Septohippocampal cholinergic neurons: Synaptic connections and survival following axotomy, *Reviews in the Neuroscience*, 3 233-248, 1992.
- 41 Gage, F. H. and Björklund A., Cholinergic septal grafts into the hippocampal formation improve spatial learning and memory in aged rats by an atropine-sensitive mechanism, *J. Neurosci.*, 6 2837-2847, 1986.
- 42 Gage, F. H. and Buzaki C., CNS grafting: Potential mechanisms of action. In F. J. Seiz (Ed.), *Neural Regeneration and Transplantation*, Vol. 6, A.R. Liss, New York, pp. 211-226, 1989.
- 43 Garcia, J., Learning without memory, *Journal of Cognitive Neuroscience*, 2 287-305, 1990.

- 44 Garcia, J. and Koelling R. A., Relation of the cue to consequence in avoidance learning., *Psychonomic Science*, 5 123-124, 1966.
- 45 Gibbs, R. B., Anderson K. and Cotman C. W., Factors affecting innervation in the CNS: comparison of three cholinergic cell types transplanted to the hippocampus of adult rats, *Brain Research*, 383 362-366, 1986.
- 46 Gibbs, R. B. and Cotman C. W., Factors affecting survival and outgrowth from transplants of entorhinal cortex, *Neuroscience*, 21 699-706, 1987.
- 47 Gibson, M. J. and Krieger D. T., Neuroendocrine brain grafts in mutant mice, *Trends in Neuroscience*, 26 331-334, 1985.
- 48 Goldberg, J. I. and Kater S. B., Experimental reduction of serotonin content during embryogenesis alters morphology and connectivity of specific identified *Helisoma* neurons, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 11 158, 1985.
- 49 Grill, H. J. and Norgren R., The taste reactivity test: mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats, *Brain Research*, 143 263-279, 1978.
- 50 Hagan, J. J., Tweedie F. and Morris R. G., Lack of task specificity and absence of posttraining effects of atropine on learning, *Behavioral Neuroscience*, 100 483-493, 1986.
- 51 Hohmann, C. F. and Ebner F. F., Basal Forebrain lesions facilitate adult host fiber in growth into neocortical transplants, *Brain Research*, 448 55-66, 1988.
- 52 Houser, C. R., Crawford G. D., Barber R. P., Salvaterra P. M. and Vaughn J. E., Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase, *Brain Res.*, 266 97-119, 1983.
- 53 Jeager, C. B. and Lund R. D., Transplantation of embryonic occipital cortex to the tectal region of newborn rats: A light microscopic study of organization and connectivity of the transplants, *Journal of Comparative Neurology*, 194 571-597, 1980.
- 54 Kesner, R. P., Berman R. F. and Tardif R., Place and taste aversion learning: role of basal forebrain, parietal cortex, and amygdala, *Brain Res. Bull.*, 39 345-353, 1992.
- 55 Kiefer, S. W., Neural Mediation of Conditioning Food Aversions, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 443 100-109, 1985.

- 44 Garcia, J. and Koelling R. A., Relation of the cue to consequence in avoidance learning, *Psychonomic Science*, 5 123-124, 1966.
- 45 Gibbs, R. B., Anderson K. and Cotman C. W., Factors affecting innervation in the CNS: comparison of three cholinergic cell types transplanted to the hippocampus of adult rats, *Brain Research*, 383 362-366, 1986.
- 46 Gibbs, R. B. and Cotman C. W., Factors affecting survival and outgrowth from transplants of entorhinal cortex, *Neuroscience*, 21 699-706, 1987.
- 47 Gibson, M. J. and Krieger D. T., Neuroendocrine brain grafts in mutant mice, *Trends in Neuroscience*, 26 331-334, 1985.
- 48 Goldberg, J. I. and Kater S. B., Experimental reduction of serotonin content during embryogenesis alters morphology and connectivity of specific identified *Helisoma* neurons, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 11 158, 1985.
- 49 Grill, H. J. and Norgren R., The taste reactivity test: mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats, *Brain Research*, 143 263-279, 1978.
- 50 Hagan, J. J., Tweedie F. and Morris R. G., Lack of task specificity and absence of posttraining effects of atropine on learning, *Behavioral Neuroscience*, 100 483-493, 1986.
- 51 Hohmann, C. F. and Ebner F. F., Basal Forebrain lesions facilitate adult host fiber in growth into neocortical transplants, *Brain Research*, 448 55-66, 1988.
- 52 Houser, C. R., Crawford G. D., Barber R. P., Salvaterra P. M. and Vaughn J. E., Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase, *Brain Res.*, 266 97-119, 1983.
- 53 Jeager, C. B. and Lund R. D., Transplantation of embryonic occipital cortex to the tectal region of newborn rats: A light microscopic study of organization and connectivity of the transplants, *Journal of Comparative Neurology*, 194 571-597, 1980.
- 54 Kesner, R. P., Berman R. F. and Tardif R., Place and taste aversion learning: role of basal forebrain, parietal cortex, and amygdala, *Brain Res. Bull.*, 39 345-353, 1992.
- 55 Kiefer, S. W., Neural Mediation of Conditioning Food Aversions, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 443 100-109, 1985.

- 56 Kim, J. J., DeCola J. P., Landeira-Fernández J. and Fanselow M. S., N-Methyl-D-Aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning, *Behavioral Neuroscience*, 105 126-133, 1991.
- 57 Kim, M. and McGaugh J. L., Effects of intra amygdala injections of NMDA receptors antagonists on acquisition and retention of inhibitory avoidance, *Brain Research*, 585 35-48, 1992.
- 58 Lamberty, Y. and Gower A. J., Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water-maze, *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de thérapie*, 305 5-19, 1991.
- 59 Langlais, P. J., Connor D. J. and Thal L., Comparison of the effects of single and combined neurotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis and dorsal noradrenergic bundle on learning and memory in the rat, *Behav. Brain Res*, 54 81-90, 1993.
- 60 Lapchak, P. A., Araujo D. M., Pasinetti G. and Hefti F., Differential alterations of cortical cholinergic and neurotensin markers following ibotenic acid lesions of the nucleus basalis magnocellularis, *Brain Res.*, 613 239-246, 1993.
- 61 Lewis, E. R. and Cotman C. W., Neurotransmitter characteristics of brain grafts: striatal and septal tissues form the same laminated input to the hippocampus, *Neuroscience*, 8 57-66, 1983.
- 62 López-García, J. C., Fernández-Ruiz J., Bermúdez-Rattoni F. and Tapia R., Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts, *Brain Research*, 523 105-110, 1990.
- 63 López-García, J. C., Fernández-Ruiz J., Escobar M. L., Bermúdez-Rattoni F. and Tapia R., 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, 1993.
- 64 Lowry, O. H., Rosebroug W. J., Farr A. L. and Randall R. S., Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 265-275, 1951.
- 65 Mallet, P. E., Beninger R. J., Flesher S. N., Jhamandas K. and Boegman R. J., Nucleus Basalis lesions: Implication of basoamygdaloid cholinergic pathways in memory, *Brain Res. Bull.*, 36 51-56, 1995.

- 66 McLoon, L. K., Lund R. D. and McLoon S. C., Transplantation of reaggregate of embryonic neural retinas to neonatal rat brain: differentiation and formation of connections, *J. Comp. Neurol.*, 205 179-189, 1982.
- 67 Mesulam, M. M., Mufson E. J., Levey A. I. and Wainer B. H., Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: Citochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata) and hypothalamus in the rhesus monkey, *Journal of Comparative Neurology*, 214 170-197, 1983.
- 68 Moyse, E., Szigethy E., Danger J. M., Vaudry H., Wenk G. L., Beaudet A. and Epelbaum J., Short and long term effects of nucleus basalis magnocellularis lesions on cortical levels of somatostatin and its receptors in the rat, *Brain Res.*, 607 154-160, 1993.
- 69 Mufson, E. J., Labbe R. and Stein D. J., Morphologic features of embryonic neocortex grafts in adults rats following frontal cortical ablation, *Brain Research*, 401 162-167, 1987.
- 70 Nabeshima, T., Behavioral aspects of cholinergic transmission: role of basal forebrain cholinergic system in learning and memory, *Progress in brain research*, 98 405-411, 1993.
- 71 Nakanishi, S., Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function, *Science*, 258 597-603, 1992.
- 72 Nicholas, M. K. and Arnason B. G. W., Immunological considerations in transplantation to the central nervous system. In L. Alan R, Inc. (Ed.), *Neural Regeneration and Transplantation, Vol. 6*, New York, pp. 239-284, 1989.
- 73 Nilsson, O. G., Shapiro M. L., Gage F. H., Olton D. S. and Björklund A., Spatial learning and memory following fimbria-fornix transection and grafting of fetal septal neurons to the hippocampus, *Expl. Brain. Res.*, 67 195-215, 1987.
- 74 Nitsch, R. M., Growdon J. H., Corkin S. and Wortman R. J., *Alzheimer Disease*, Annals of the New York Academy of Science, New York, 1994.
- 75 Norgren, R., Gustatory afferents to ventral forebrain, *Brain Research*, 81 285-295, 1974.
- 76 Norgren, R. and Wolf G., Projections of thalamic gustatory and lingual areas in the rat, *Brain Research*, 92 123-129, 1975.
- 77 Nothias, F., Onteniete B., Geffard M. and Peschanski M., Rapid growth of host afferents into fetal thalamic transplants, *Brain Research*, 463 334-345, 1988.

- 78 Oka, J. I., Metherrate R. S. and Hicks T. P., Excitatory amino acid antagonists and synaptic transmission in the cat's intact thalamo-cortical somatosensory pathway. In T. P. Hicks, D. Lodge and H. McLennan (Eds.), *Excitatory amino acid transmission*, New York, pp. 401-404, 1987.
- 79 Ormsby, C. and Bermúdez-Rattoni F., Induced remembrance of taste aversions by cortical implants., *Society for Neuroscience Abstracts*, 20 1211, 1995.
- 80 Ormsby, C. E., Efectos de los implantes cerebrales sobre la evocación de las respuestas condicionadas. , Tesis para obtener el grado de Licenciatura el Psicología , (1994).
- 81 Roger, R. C., Novin D. and Butcher L. L., Hepatic sodium and osmoreceptor activate neurons in the ventrobasal thalamus, *brain Research*, 168 398-403, 1981.
- 82 Rosenbland, C. and Nilsson G., Basal forebrain grafts in the rat neocortex restore *in vivo* acetylcholine release and respond to behavioural activation, *Neuroscience*, 55 353-362, 1993.
- 83 Rosenblum, K., Meiri M. and Dudai Y., Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory neocortex, *Behavioral and Neural Biology*, 59 49-56, 1993.
- 84 Rush, D. K., Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition, *Behavioral and neural biology*, 50 255-278, 1988.
- 85 Sangsttock, G. J., Johnson K. B., Jantzen P. T., Meyer E. M., Dunn A. J. and Arendash G. W., Nucleus basalis lesions in neonate rats induce a selective cortical cholinergic hypofunction and cognitive deficits during adulthood, *Exp. Brain Res.*, 90 163-174, 1992.
- 86 Saper, C. B., Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II Magnocellular basal nucleus, *Journal of Comparative Neurology*, 222 313-42, 1984.
- 87 Schoepfer, R., Monyer H., Sommer B., Wisden W., Sprengel R., Kuner T., Lomeli H., Herb A., Köhler M., Burnashev N., Günther W., Ruppersberg P. and Seeburg P., Molecular biology of glutamate receptors, *Progress in Neurobiology*, 42 353-357, 1994.
- 88 Schwartzbaum, J. S., Electrophysiology of taste-mediated functions in parabraquial nuclei of behaving rabbit, *Brain Research Bulletin*, 11 68-89, 1983.
- 89 Seeburg, P. H., The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels, *TINS*, 16 359-365, 1993.

- 90 Sinden, J. D., Hodges H. and Gray J. A., Neural transplantation and recovery of cognitive function, *Behavioral and brain science*, 18 10-35, 1995.
- 91 Spangler, E. L., Rigby P. and Ingram D. K., Scopolamine impairs learning performance of rats in a 14-unit T-maze, *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 25 673-679, 1986.
- 92 Spignoli, G., Magnani M., Giovannini M. G. and Papeu G., Effect of pyroglutamic acid stereoisomers on ECS and scopolamine induced memory disruption and brain acetylcholine levels in the rat, *Pharmacology Research Communications*, 19 901-912, 1987.
- 93 Sprengel, R. and Seeburg P. H., The unique properties of glutamate receptor channels, *FEBS letters*, 325 90-94, 1993.
- 94 Squire, L. R., Memory and the Hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans, *Psychological Review*, 99 195-231, 1992.
- 95 Steckler, T., Andrews J. S., Marten P. and Turner J. D., Effects of NBM lesions with two neurotoxins on spatial memory and autoshaping, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44 877-889, 1993.
- 96 Stein, D. G. and Mufson E. J., Morphological and behavioral characteristics and embryonic brain tissue transplants in adult, brain-damaged subjects. In: Cell and tissue transplants into the adult brain, *Annals of the New York Academy of Science*, 495 444-465, 1987.
- 97 Stenevi, U., Björklund A. and Svengaard N., Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: Techniques and conditions for survival, *Brain Research*, 114 1-20, 1976.
- 98 Sunde, M. and Zimmer J., Cellular histochemical and connective organization of the hippocampus and fascia dentata transplanted to different regions of immature and adult rat brains, *Dev. Brain Res.*, 8 165-192, 1983.
- 99 Torvik, A., Afferent connections to the sensory trigeminal nucleus of the solitary tract and adjacent structures: An experimental study in the rat, *J. Comp. Neurol.*, 106 51-141, 1956.
- 100 Van-der-Zee, E. A., Streefland C., Strosberg A. D., Schroder H. and Luiten P. G. M., Visualization of cholinceptive neurons in the rat neocortex: Colocalization of muscarinic and nicotinic receptors, *Molecular Brain Research*, 14 326-336, 1992.

- 101 Varon, S., Hagg T., Vahlsing L. and Manthorpe M., Nerve growth factor in vivo actions on cholinergic neurons in the adult rat CNS. In L. E. Todd, L. Packer and J. Jaz (Eds.), *Cell Function and Disease*, Plenum Press, New York, pp. 235-248, 1988.
- 102 Victorin, K., Simerly R. B., Isacson O., Swanson L. W. and Björklund A., Connectivity of striatal grafts implanted into the ibotenic acid lesioned striatum: III. Efferent projecting graft neurons and their relation to host afferents within the grafts, *Neuroscience*, 30 427-492, 1989.
- 103 Will, B. and Hefti F., Behavioral and neurochemical effects of chronic intraventricular injections of nerve growth factor in adult rats with fimbria fornix lesions, *Behavioral Brain Research*, 17 17-24, 1985.
- 104 Winkler, J., Suhr S. T., Gage F. H., Thal L. J. and Fisher L. J., Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory, *Nature*, 375 484-487, 1995.
- 105 Woolf, N. J., Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord, *Progress in Neurobiology*, 37 475-524, 1991.
- 106 Yamamoto, T. and Kawamura Y., Summated Cerebral Responses to Taste Stimuli in Rat, *Physiological Behavior*, 9 789-793, 1972.
- 107 Yamamoto, T., Matsuo R. and Kawamura Y., Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination, *Journal of Neurophysiology*, 44 440-454, 1980.
- 108 Yamamoto, T., Shimura T., Sako N., Azuma S., Bai W.-Z. and Wakisaka S., *C-fos* expression in the rat brain after intraperitoneal injection of lithium chloride, *NeuroReport*, 3 1049-1052, 1992.
- 109 Yamamoto, T., Yayama N. and Kawamura Y., Cortical neurons responding to tactile, thermal, and taste stimulations of the rat's tongue, *Brain Research*, 221 202-206, 1981.
- 110 Yirmiya, R., Zhou F. C., Holder M. D., Deems D. A. and García J., Partial recovery of gustatory function after neural tissue transplantation to the lesioned gustatory neocortex, *Brain Research Bulletin*, 20 619-625, 1988.
- 111 Zhou, F. C., Averbach J. B. and Azmitia E. C., Denervation of serotonergic fibers in the hippocampus induced trophic factor which enhances the maturation of transplanted serotonergic neurons but not norepinephrine neurons, *Journal of Neuroscience Research*, 17 235-246, 1987.
- 112 Kupfermann, I., Learning and memory, In Principles of Neural Science, Chapter 64. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. Elsevier, New York, 1991.