

58
2ej.

ESTUDIO SOBRE EL RESTABLECIMIENTO

DE CONEXIONES NEURALES

EN TRANSPLANTES DE TEJIDO CEREBRAL FETAL

MARTHA LILIA ESCOBAR RODRIGUEZ

TESIS PROFESIONAL

B I O L O G O



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO
CIENCIAS**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

Introducción	1.
CAPITULO I	
Antecedentes Generales	
Los Transplantes y la Recuperación Funcional	3
Antecedentes Neuroanatómicos de los transplantes	8
La Interfase Transplante-Huésped	15
CAPITULO II	
Relación de la Neocorteza Gustativa y del Complejo Amigdalino con el Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS)	
El Condicionamiento Aversivo a los Sabores	19
Fundamentos Neuroanatómicos	20
Neuroanatomía de la Neocorteza Gustativa y del Complejo Amigdalino	24
La Neocorteza Gustativa	24
El Complejo Amigdalino	27
- Grupo Nuclear Corticomedia]	29
- Grupo Nuclear Basolateral	29
- Conexiones Eferentes	29
- Conexiones Aferentes	31
- Neurotransmisores	32
- Neuropéptidos	33
CAPITULO III	
Métodos en el Trazado de Vías Neuronales	
Consideraciones Generales	35
Peroxidasa de Rábano	38
- Aplicaciones Básicas	39
- Características de la Peroxidasa de Rábano	40

- Proceso de Incorporación de la HRP	43
- Variantes Metodológicas	45
- Generalidades sobre la HRP	46
- Ventajas y Limitaciones de la Técnica	49
CAPITULO IV	
Planteamiento de Objetivos	51
CAPITULO V	
Procedimiento	
a) Sujetos	55
b) Lesión y Transplante	56
c) Histoquímica	
c.1) Administración del Trazador	57
c.2) Fijación y Corte	59
c.3) Detección de Trazadores	59
Resultados y Discusión Parcial	62
CAPITULO VI	
Discusión General	74
Bibliografía	80

INTRODUCCION

1

El interés en la problemática inherente a la recuperación de la funcionalidad de las estructuras involucradas en las diversas afecciones cerebrales, ha venido incrementándose día con día, de manera que el ser humano ha puesto en juego su habilidad, creatividad e inteligencia con el propósito de hallar nuevos y mejores sistemas de aproximación que le permitan adentrarse en el conocimiento de los orígenes, desarrollo y posibles soluciones de los trastornos que aquejan al Sistema Nervioso Central.

Uno de los métodos de aproximación más recientes e interesantes involucra a los trasplantes de tejido cerebral fetal, efectuados directamente en el cerebro adulto dañado (Bjorklund et al., 1980). En experimentos realizados en los últimos años, las deficiencias conductuales asociadas con daño a los sistemas nigro-estriatal y septo-hipocampal, han sido notoriamente disminuidos mediante el implante de neuronas dopaminérgicas o de trasplantes en bloque de septum fetal en los sitios lesionados (Bjorklund y Stenevi, 1979; Dunnett et al., 1982). Los estudios anatómicos con trazadores anterógrados y retrógrados han mostrado también que los trasplantes pueden establecer conexiones con el cerebro huésped (McLoon et al., 1981; Labbe et al., 1983), mientras que los experimentos electrofisiológicos muestran que los implantes neurales son capaces de formar sinapsis funcionales (Low et al., 1982).

A la luz de estos descubrimientos, la capacidad de los² transplantes para mediar la recuperación conductual así como para generar y/o potenciar el desarrollo y regeneración de conexiones neuronales en el Sistema Nervioso Central, augura grandes perspectivas a las neurociencias y en particular a la Neurobiología de los Transplantes.

Antecedentes Generales.

Los Transplantes y la Recuperación Funcional

Tradicionalmente se había considerado que la capacidad regenerativa del sistema nervioso de mamíferos era nula a diferencia de la encontrada en aves y en anfibios (Cowan et al., 1965). Sin embargo, actualmente se ha encontrado que también en mamíferos se pueden efectuar transplantes dentro del Sistema Nervioso Central (SNC).

Ranson (1903), Saltikow (1905) y Altobelli (1914) efectuaron algunos de los primeros trabajos de transplantes de tejido nervioso de mamíferos. Mediante esta técnica, dichos autores observaron que los transplantes a la región telencefálica en ratas adultas llegaban a sobrevivir por periodos cortos de tiempo, más tarde el mismo Ranson (1914) y Le Gros Clark (1940), demostraron que tejido nervioso tomado de fetos de ratas no sólo sobrevivía durante periodos largos de tiempo, sino que además desarrollaba neuronas totalmente diferenciadas. Recientemente se ha comprobado que los transplantes crecen y se desarrollan adecuadamente en huéspedes de la misma especie que el donador, y se ha demostrado asimismo la posibilidad de realizar transplantes en sujetos de diferentes especies (Bjorklund et al., 1982).

El ímpetu por el estudio de los transplantes de tejido nervioso es muy reciente y las estrategias empleadas en tales estudios han sido muy diversas, destacan por ejemplo, los experimentos de transplante de tejido nervioso a la región intraocular.

Algunas otras regiones exploradas son: el tallo cerebral, ²⁷ el hipocampo, el cerebelo y la corteza cerebral.

En 1985 McConnell realizó un experimento con transplantes de células corticales en el que demuestra que la secuencia de diferenciación morfológica y la eventual migración de las neuronas injertadas, exhiben características similares a las observadas en las neuronas análogas del tejido huésped.

Reafirmando lo anterior, Jaeger y Lund (1980) proponen que los transplantes de células corticales están compuestos de neuronas generadas antes y después del transplante. Las células precursoras continúan en mitosis y siguen el patrón de la neurogénesis normal (Jaeger y Lund, 1981).

A partir de los estudios morfológicos realizados por Kromer et al. en 1980, se han obtenido algunas premisas que hasta el momento parecen ser aplicables a la mayoría de los transplantes:

- a) Las células neuroepiteliales de las diversas regiones estudiadas continúan proliferando después de transplantarse al SNC produciendo neuronas con características morfológicas normales;
- b) las células que se diferencian antes de que se realice el transplante, son capaces de sobrevivir y mantener el arreglo citoarquitectónico original en su nuevo ambiente;
- c) las características de organización intrínseca y de organización tridimensional de las regiones transplantadas pueden desarrollarse aún en un sitio ectópico del SNC adulto.

Ahora bien, con el fin de encontrar correlaciones entre la integración anatómica y funcional de los transplantes, Arendash y Gorski (1982) transplantaron tejido del área preóptica media

(MPOA), portadora del núcleo dimórfico sexual, de ratas machos de un día de nacidos a huéspedes adultos hembras y observaron que en las ratas huésped se presentaron incrementos significativos de las conductas sexuales típicas de los machos, debido al trasplante y no a los niveles hormonales que permanecieron constantes, es decir, la modificación conductual se debió a las conexiones del trasplante con su huésped.

La funcionalidad de los trasplantes ha sido estudiada ampliamente, a través de dos modelos bien conocidos que son: la vía nigro-estriatal y la septo-hipocampal.

Consideremos en primera instancia la vía nigro-estriatal. Es sabido que una de las principales vías del sistema extrapiramidal es la vía dopaminérgica nigro-estriatal, en la que, la pérdida de dopamina, debida a la degeneración de las fibras constitutivas, origina deficiencias motoras en el sujeto dañado, patología conocida como enfermedad de Parkinson.

Así pues, con el fin de encontrar un tratamiento para este mal se han propuesto modelos experimentales en animales. En uno de estos modelos se lesiona unilateralmente a la sustancia nigra y se aplica apomorfina al sujeto, observándose una conducta de giro contralateral. Tales sujetos son sometidos posteriormente al trasplante de células de sustancia nigra, procedentes de fetos de 15 a 17 días de gestación. Los resultados obtenidos de estos experimentos son muy gratificantes, puesto que se ha encontrado una notable mejoría en los sujetos, en los que se observa la disminución en la conducta de giro debida a la

aplicación de apomorfina (Olson et al., 1984). El avance en los estudios de trasplantes con este modelo ha permitido efectuar, inclusive, trasplantes de células cromafines procedentes de médula supradrenal en núcleo caudado de humanos, (Madrazo et al., 1987; Olson et al., 1984), observándose una notable mejoría en los pacientes.

Ahora bien, con el propósito de investigar la especificidad de las inervaciones que el trasplante establece con el tejido huésped, Bjorklund y Stenevi (1977) han empleado el segundo modelo, el cual utiliza la vía septo-hipocampa], mediante este modelo los autores han demostrado que cuando a los axones en crecimiento, procedentes de tejido transplantado, se les presenta la posibilidad de "elegir" entre diferentes campos terminales denervados, los axones muestran clara preferencia por las zonas inervadas originalmente por los tipos correspondientes de fibras homólogas.

A partir de los trabajos anteriores, uno de los hallazgos más interesantes ha sido que el SNC, admite el trasplante de tejido nervioso con una mínima posibilidad de rechazo. Esto puede deberse, a que el SNC de los mamíferos se encuentra aislado del resto del cuerpo por la barrera hematoencefálica y, en consecuencia, del sistema inmunológico. Este postulado ha sido cuestionado por varios autores, debido fundamentalmente, a la deficiente integración de la barrera hematoencefálica que exhiben algunos implantes, como lo señaló Paul Sanberg en un congreso sobre trasplantes, organizado recientemente en la Universidad de

Rochester (New York, 1987).

Con base en diferentes estudios, se ha definido una serie de variables que son fundamentales para realizar con éxito los trasplantes de tejido nervioso, estas variables son: la edad del donador, el sitio de trasplante, y la edad del huésped. Tal vez la edad del donador sea el punto más importante a considerar, puesto que se ha demostrado que este parámetro es crucial para predecir si el trasplante va a sobrevivir o no.

A este respecto, en un estudio reciente realizado por Das et al. (1983), se reportó que al transplantar tejido de neocorteza de diferentes edades, la cantidad de tejido que se encontraba al efectuar el estudio histológico de los huéspedes, variaba de una manera inversamente proporcional a la edad del feto.

En cuanto a la ubicación del implante las células transplantadas pueden colocarse en tres sitios: a) En los ventrículos; b) en una cavidad preparada previamente, ya sea con una lesión electrolítica, por succión o por inyección de alguna droga; y c) en algunos casos se inyectan directamente las células sin prepararles ninguna cavidad, con el fin de analizar su desarrollo. La selección de cualquiera de estos sitios atiende por lo general al objeto de estudio. Por último, la edad del huésped aparentemente es algo irrelevante para la adecuada formación de los trasplantes, como lo demuestran los trabajos de Hallas et al., 1980, en los cuales fue analizado el crecimiento de los trasplantes en huéspedes de diferentes edades, poniendo de manifiesto que, a partir de trasplantes realizados en ratas transplantadas con edad de 10 días, el

crecimiento de éstos era prácticamente igual en todos los sujetos, sin mostrar variación debida a la edad del huésped.

Antecedentes Neuroanatómicos de los Transplantes

El advenimiento de la técnica de los transplantes cerebrales ha permitido una aproximación al estudio del desarrollo y regeneración de conexiones neuronales en el SNC de mamíferos (Bjorklund y Stenevi, 1984).

Durante la década pasada se han registrado grandes avances en este campo, respaldando así los primeros indicios positivos que sobre implantes de tejido nervioso se habían obtenido hacia principios de siglo. Hoy en día, se sabe que prácticamente todas las secciones del neuroeje pueden ser transplantadas con grandes probabilidades de sobrevivencia, no solamente en SNC de animales neonatos o jóvenes, sino también en el cerebro y médula espinal de individuos adultos.

Stenevi et al. (1976), fueron los primeros en estudiar de manera sistemática las posibilidades de mejorar las técnicas de transplante en SNC de mamíferos adultos, a fin de obtener mejores resultados. Sin embargo, los estudios clásicos sobre los mecanismos de regeneración neuronal en vertebrados inferiores, han proporcionado las premisas básicas para las nuevas investigaciones al respecto.

Matthey (1926), Stone (1944), Stone y Zaur (1940) y Sperry (1947), mostraron que algunas estructuras oculares transplantadas o reimplantadas en salamandras adultas, eran capaces de regenerar

nuevamente los patrones de conexión retinotectal, restaurando por ende la visión.

Otros ejemplos de transplantes funcionalmente exitosos en vertebrados inferiores, son los implantes de segmentos de médula espinal en anfibios y aves jóvenes, los cuales, establecen conexiones neuromusculares que permiten así, el movimiento normal y coordinado de las extremidades (Detwiler, 1936; Piatt, 1940; Weiss, 1950; Székely, 1963, 1968; Straznický, 1963). Por su parte, las investigaciones efectuadas en invertebrados, también han jugado un papel importante en el estudio de la regeneración neuronal debida a los implantes. Así, en 1986, Fredman y Gage efectuaron una serie de investigaciones que aportan sólidas evidencias para la regeneración de conexiones sinápticas específicas en el molusco *Aplysia*.

Así pues, queda de manifiesto que entre las características más relevantes de los transplantes neuronales intracerebrales destaca su capacidad para establecer conexiones extensas con el cerebro huésped. Varios estudios, tanto en huéspedes adultos como en neonatos, han demostrado la presencia de proyecciones procedentes de las neuronas ubicadas en el implante hacia áreas en el cerebro huésped (Bjorklund et al., 1976, 1979, 1980; Bjorklund y Stenevi 1977, 1979; Beebe et al., 1979; Jaeger y Lund, 1979, 1980; McIloon y Lund, 1980; McIloon et al., 1982; Kromer y Bjorklund, 1980; Oblinger y Das, 1982; Oblinger et al., 1980; Lewis y Cotman 1980, 1983), así como proyecciones del huésped hacia el transplante (Lund y Hauschka, 1976; Oblinger et al., 1980; Jaeger y Lund, 1980; Lund y Harvey, 1981; Harvey y

Lund, 1981; Kromer et al., 1981; Oblinger y Das, 1982; Hallas et al., 1980; Sunde y Zimmer, 1983; Segal et al., 1981).

Aunque el establecimiento de conexiones entre el implante y el huésped puedan ser influenciadas tanto por el estadio de desarrollo del cerebro huésped, como por la localización del implante así como por la técnica quirúrgica empleada, parece claro que tales conexiones pueden exhibir un alto grado de especificidad (Bjorklund y Stenevi, 1984).

De esta manera, numerosas evidencias experimentales, confirman el alto grado de integración que pueden llegar a alcanzar los implantes neuronales en diversas estructuras del SNC, cabe destacar algunos de tales trabajos. En 1985 Anderson et al. demuestran mediante técnicas inmunocitoquímicas, que neuronas septales implantadas en el hipocampo de roedor, marcadas positivamente con acetilcolintransferasa (ChAT), forman sinapsis asimétricas con el tejido huésped y además reciben sinapsis de naturaleza no colinérgica. Wiegand y Gash (1985) demuestran mediante el empleo de peroxidasa de rábano (HRP) la existencia de proyecciones eferentes del núcleo supraquiasmático contenido en transplantes intraventriculares de hipotálamo anterior fetal.

Isacson et al. (1985) describen la funcionalidad conductual y anatómica de transplantes neurales ubicados en el estriado (caudado-putamen) de ratas lesionadas previamente con ácido iboténico, su evaluación histológica revela altas densidades neuronales dentro de los transplantes y la expresión positiva de acetilcolinesterasa en toda la muestra.

En su estudio sobre la restauración específica de conexiones

neurales hipocampales por células granulares dentadas, transplantadas a ratas previamente lesionadas con rayos X, Zimmer et al. (1985) detectan que, hacia la tercera semana de desarrollo post-transplante se alcanza el máximo "intercambio neuronal" entre el implante y el huésped, de tal suerte, que el transplante envía proyecciones hacia las fibras musgosas de la capa CA3 del huésped, mientras recibe axones procedentes de las fibras comisurales y de la vía perforante entorrinal.

En 1985 Ebner y Erzurumlu, demostraron que los trasplantes de tejido embrionario, particularmente de células neocorticales en suspensión son susceptibles de recibir inervación por parte de axones talamocorticales de huéspedes de diferentes edades, con este fin, fueron analizados individuos neonatos así como de 3 y 30 días de edad. La reinervación más profusa se registró en los neonatos, en tanto que en los individuos de 30 días se detectaron proyecciones escasas.

Las observaciones en el sentido de que los trasplantes de núcleo supraóptico y paraventricular hipotalámicos, colocados en el diencéfalo lateral de huéspedes adultos jóvenes, reciben inervación por parte de fibras noradrenérgicas provenientes del cerebro medio anterior (MFB), han sido obtenidas por Silverman et al. (1985), quienes evaluaron tales evidencias en varios tiempos post-transplante (6, 12 y 20 días), la reinervación más adecuada se registró en sujetos con 20 días post-implante, además detectaron mediante microscopía electrónica sinapsis axodendríticas y axosomáticas.

Un estudio fino efectuado por Brasko y Das (1986) en el que se rastreó el desarrollo, la diferenciación y la integración de los trasplantes nos brinda algunos parámetros interesantes acerca de la paulatina formación de la interfase y ulterior conectividad entre el implante y el huésped. Para tal efecto, fue transplantado tejido neocortical de fetos de 17 días, en el hemisferio cerebelar derecho de ratas adultas, las cuales fueron sacrificadas y analizadas a diferentes tiempos. El análisis reveló la presencia de áreas densamente pobladas de tejido transplantado viable, en estrecha aposición con el huésped después de 24 horas post-transplante. Tras dos días de sobrevivencia el trasplante presentó un enlace parenquimal inicial con el cerebro huésped. Hacia los días 4 y 5 la formación de un verdadero neuropilo implante-huésped, constituía en sí una interfase real entre los dos tejidos. Por el día 15, los implantes alcanzaron un gran crecimiento, presentaron agregados celulares interrelacionados a través de una fina red de axones que constituyó el sistema de conexiones intrínsecas del trasplante. Finalmente entre los 15 y 90 días post-cirugía una serie de fibras provenientes de la región pontina penetraron en el implante alcanzando la capa medular del mismo.

Este trabajo pone de manifiesto la importancia de la interfase que constituye la piedra angular sobre la que habrá de sustentarse el establecimiento de interconexiones.

Finalmente en relación a los patrones de interconexión trasplante-huésped, mencionaremos el trabajo de Ross y Ebner (1985), en el que los autores identifican la capacidad

diferencial de varios núcleos talámicos, complejo ventrobasal (VB) y núcleo posteromedial (POM) para inervar a transplantes de tejido neocortical embrionario ubicados en la corteza somatosensorial primaria (SI) de ratas adultas, dichos transplantes reciben aferentes desde POM pero no de VB, lo cual revela una sensibilidad diferencial de ambos núcleos hacia la axotomía y en consecuencia hacia la reinervación potencial.

Al considerar la serie de evidencias en cuanto a la interconexión trasplante-huésped, la pregunta insoslayable a resolver, era sin lugar a dudas, la relativa a la naturaleza de los cambios que promovían y/o obstaculizaban la reinervación. En este sentido, el papel determinante que juegan los factores tróficos en la promoción y "guía" de la regeneración axonal, queda de manifiesto en numerosos trabajos como los de Neuberger et al. (1986) y Cornbrooks y Kromer (1986), en los que se relaciona el tiempo de regeneración axonal asociado con transplantes de células de Schwann, las cuales son capaces de liberar factores que promueven la regeneración de neuronas colinérgicas, de acuerdo a estos autores. A este respecto, el factor de crecimiento neural (NGF), es el prototipo de la molécula neural trófica, fue descubierta hace aproximadamente 30 años por Levi-Montalcini (1952), y su secuencia de aminoácidos se halla bien caracterizada, consolidándose así, como uno de los modelos moleculares de empleo más generalizado, en el estudio de los fenómenos relacionados con la ontogenia e interacción trófica. No obstante, en años recientes, han sido caracterizadas

algunas otras moléculas tróficas, tales como el factor neurotrófico (NTF) por Muller et al., 1984, y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) hacia principios de la década de 1980.

Hasta hace poco, se pensaba que la actividad del NGF se restringía a neuronas periféricas originadas a partir de las crestas neurales, pero en los últimos años se han encontrado evidencias en el sentido de que el NGF regula el desarrollo y mantenimiento de poblaciones de neuronas cerebrales (Nieto-Sampedro et al., 1982). Existen además reportes en los que se demuestra que el NGF incrementa específica y selectivamente el crecimiento de neuronas colinérgicas en transplantes de caudado putamen y complejo de ganglios basales en rata (Black, 1985).

En la extensa literatura que sobre transplantes se ha generado en los últimos años, resulta relativamente frecuente el encontrar que los fenómenos de reconexión implante-huésped son adjudicados en buena medida a la presencia y actividad de factores tróficos, uno de estos trabajos es el de Sharp y González (1985) en el que con el fin de probar la hipótesis de que los transplantes corticales fetales pueden disminuir la atrofia talámica causada por disturbios neonatales de la corteza frontal (CF), estos autores colocaron implantes unilaterales de corteza frontal de embriones de 18 días de gestación en un grupo de ratas a las cuales se les había disectado la CF al nacer, un segundo grupo de ratas recibió gelfoam, el cual, es un material sintético y biodegradable que en ocasiones funciona como sustento

de fibras neuronales. Noventa días después, ambos grupos fueron sacrificados y las áreas talámicas respectivas fueron analizadas. Las áreas talámicas ipsilaterales al transplante de CF, mostraron dimensiones significativamente mayores que las correspondientes al grupo que recibió gelfoam, de acuerdo a los autores, este fenómeno puede deberse a los efectos tróficos del transplante sobre la corteza y el tálamo del huésped neonato.

La inoculación de peroxidasa de rábano marcada con lecitina de germen de trigo (WGA-HRP) demostró la existencia de interconexiones transplante huésped. La identificación de proyecciones talámicas del huésped, sugiere que los transplantes constituyen un blanco para el desarrollo de neuronas talámicas. Estos resultados establecen que los trastornos en la corteza frontal de individuos neonatos, pueden ser aminorados por los transplantes corticales fetales y que estas acciones se deben en buena medida, a la presencia de factores tróficos.

La Interfase Transplante-Huésped

El estudio neuroanatómico de los transplantes, involucra necesariamente el análisis de la reacción glial presente durante la integración de los tejidos transplante-huésped.

Durante los 10 días posteriores a la lesión del SNC, ha sido detectada, la formación de una capa meníngeo-glial que consta de una membrana basal, fibroblastos y células gliales (Wujek y Reir, 1984), la cual constituye una barrera mecánica para el crecimiento axonal (Kiernan, 1979; Berry, 1979, 1983, 1985), en

consecuencia, los axones que tiendan a cruzar la interfase transplante-huésped (T/H) habrán de atravesar antes de que la barrera se haya establecido, o bien, alternativamente, es posible que la "cicatrización glial" sea retrasada o inhibida por acción del implante.

El transplantar tejido cerebral fetal al SNC adulto conlleva el siguiente juego de interacciones: 1) El SNC del huésped reacciona ante el transplante; 2) los transplantes fetales reaccionan ante la pérdida de su ambiente normal, aunque su crecimiento y diferenciación son restaurados posteriormente y 3) el transplante y el huésped tienden a establecer comunicación a través del intercambio de conexiones recíprocas.

A este respecto, Gibs y Cotman (1986), sugieren en su trabajo sobre la sobrevivencia y crecimiento de transplantes, que: 1) el introducir un lapso entre la lesión y el transplante, incrementa las probabilidades de sobrevivencia y un adecuado desarrollo de los implantes y 2) que, generalmente, las fibras formadas en los transplantes compiten selectivamente con las proyecciones nativas del huésped durante el proceso de reinervación.

La ausencia de una cicatrización profusa en regiones de estrecha aposición T/H sugiere que el tejido del SNC fetal transplantado interfiere con el proceso de formación de la citada barrera glial. Dos explicaciones parecen plausibles, en primera instancia, el transplante fetal puede inhibir el crecimiento de fibroblastos o el alineamiento de células y procesos astrogliales, mediante la neutralización de la actividad del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Berry, 1985). La

presencia del inhibidor del FGF puede explicar la ausencia de invasión fibroblástica en cerebros de animales neonatos y fetales (Berry et al., 1983).

Un fenómeno interesante en este contexto, es la observación de que las células gliales procedentes del trasplante fetal, migran hacia el cerebro huésped (Lindsay, 1984; Raisman, 1972); tal migración puede suprimir la cicatrización en el parénquima del huésped, ya sea por secreción de factores inhibitorios o por el establecimiento de contacto con células astrogliales del huésped. La segunda explicación supone que la cicatrización es dependiente del contacto de la astroglia con fibroblastos y/o con la matriz extracelular derivada de los fibroblastos. Se ha propuesto que estos últimos pueden ser alejados mecánicamente de la astroglia, tanto en el cerebro inmaduro como en la interfase T/H, en virtud de que el crecimiento neuronal puede ocupar la zona necrótica hacia los márgenes de la lesión, imposibilitando así el contacto astroglia-fibroblasto, y potenciando, por ende, la reinervación (Raisman, 1972).

Tanto la glía fetal como la glía reactiva del adulto, pueden secretar laminina, la cual, es una sustancia capaz de proveer un sustrato para el crecimiento de axones y dendritas (Liesi, 1983; Liesi et al., 1983; Liesi et al., 1984).

En conclusión, Kruger et al. (1986) demuestran la existencia de tres diferentes tipos morfológicos de interfase desarrollados entre trasplante y huésped, dos de los cuales difieren de la cicatrización típica del SNC adulto. Así pues, el trasplante neuronal altera la respuesta del huésped ante el trauma e inhibe

el proceso de cicatrización normal, ya sea por la liberación de factores inhibitorios que actúen sobre astroglia y/o fibroblastos, o bien por la prevención mecánica del contacto entre la astroglia del huésped y los fibroblastos, los cuales son necesarios para la consolidación de la barrera glial.

CAPITULO II

Relación de la Neocorteza Gustativa y del Complejo Amigdalino
con el Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS)

El Condicionamiento Aversivo a los Sabores.

En nuestro laboratorio hemos utilizado el modelo conductual de Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS), originalmente propuesto por John García, en la década de 1960, para evaluar la recuperación de los trasplantes de tejido cerebral en ratas previamente lesionadas. García et al. en 1985 propusieron un modelo de condicionamiento en el que involucraron a los mecanismos de defensa externos e internos que se desarrollaron en los vertebrados como consecuencia de las presiones selectivas dentro de la cadena alimenticia (García et al., 1955).

Los estímulos pertenecientes al sistema externo como son sonidos, choques eléctricos, mordeduras, etc., y los asociados con el sistema interno, como es la irritación gástrica; son integrados en sustratos anatómicos independientes en el Sistema Nervioso Central (García et al., 1985; Bermúdez-Rattoni, 1986).

Dentro del sistema interoceptivo, el CAS desarrollado por García, ha sido desde la década de 1960 un método utilizado ampliamente en gran variedad de especies. En este tipo de condicionamiento, el gusto se presenta como estímulo condicionado (EC), el cual es seguido por irritación gástrica, como estímulo incondicionado (EI). Una vez que el animal ha integrado esta información, generalmente desarrolla una aversión al gusto cuando se le presenta nuevamente este estímulo.

Fundamentos Neuroanatómicos

García et al. (1967) han sugerido que el CAS es un reflejo de la organización del sistema nervioso central. En este sentido se sabe que las fibras nerviosas que llevan información visceral y gustativa convergen en el núcleo del tracto solitario. Esta relación anatómica provee un circuito que procesa tanto la información gustativa como los efectos viscerales que suceden a la ingestión de alimentos (García et al., 1985).

Entre las estructuras cerebrales superiores que se han asociado al CAS están: 1) La amígdala (núcleos central y basolateral), Nachman y Ashe (1974); la región septal (Mc Gowan et al., 1969); el hipocampo (Miller et al., 1971); e hipotálamo (Gold y Proulx, 1972), en el sistema límbico y 2) el área gustatoria de la neocorteza (Braun et al., 1972; Norgren y Wolf, 1975).

En mamíferos, las aferencias gustativas que ascienden a través de los nervios VII, IX y X, establecen relevos de primer orden en los tercios rostrales del núcleo del tracto solitario. Asimismo, este núcleo recibe aferencias viscerales provenientes de las ramas hepáticas del nervio vago que son sensibles a la irritación gástrica; del área postrema, la cual detecta la presencia de toxinas en la circulación periférica, así como del sistema vestibular, con sensibilidad a náusea producida por movimiento. El relevo gustativo de segundo orden, constituido por neuronas con capacidad de respuesta ante estímulos gustativos, se ha localizado en el - área parahraquial del puente o área gustativa -

pontina, la cual emite proyecciones hacia el núcleo posteromedial ventral del tálamo (PMV). Las neuronas del núcleo PMV envían proyecciones gustativas hacia la corteza somatosensorial ventral e insular anterior en la rata (Áreas 13 y 14 de la neocorteza), denotada como Neocorteza Gustativa (NG) (Braun et al., 1982).

Lasiter et al. (1982) han reportado la existencia de proyecciones directas entre el área pontina del gusto y la neocorteza gustativa de la rata, por su parte Saper (1982) y Shipley (1982) han mostrado que las neuronas de la NG insular proyectan axones hacia el complejo parabraquial y la región caudal del núcleo del tracto solitario. Un año después, en 1983, Lasiter y Glanzman demuestran que las aferencias pontinas que recibe tanto el núcleo ventromedial talámico como la NG tienen su origen en las mismas neuronas, es decir, colaterales axónicas del área gustativa del puente proyectan tanto hacia PMV como a NG.

El papel de cada uno de estos patrones neurales en la sensibilidad gustativa, ha sido inferido a través de métodos conductuales, electrofisiológicos y neuroanatómicos, lo que ha hecho posible el concluir con alguna seguridad que, mientras las zonas talámicas (PMV) y parabraquial pontina, se hallan involucradas en la percepción del gusto, la neocorteza gustativa se relaciona fundamentalmente con la discriminación gustativa fina así como con la modulación conductual gustativa (Lasiter et al., 1982).

Dentro del sistema límbico, una de las estructuras con mayor profusión de aferencias gustativas, es el núcleo central de la amígdala. Estas aferencias provienen de proyecciones directas del

área gustativa pontina así como del núcleo del tracto solitario (Voshart y Van del Kooy, 1981).

Recientemente se ha encontrado que las neuronas del núcleo central de la amígdala proyectan axones al complejo parabranchial y al núcleo solitario, lo cual indica que la amígdala pudiese tener un papel modulador sobre la actividad de las neuronas de los primeros relevos de las aferencias gustativas y viscerales (Krettek y Price, 1978; Price y Amaral, 1981), (fig. 1).

En 1982 Lasiter reporta que la neocorteza gustativa recibe aferencias directas provenientes de los núcleos amigdalinos lateral y basolateral, tales proyecciones amígdalo-corticales ascienden hacia la neocorteza gustativa por vía de la cápsula externa y el claustrum. El papel de estas aferentes en el condicionamiento aversivo a los sabores fue elucidado a través de la producción de lesiones en las diferentes estructuras involucradas; cápsula externa, claustrum, neocorteza gustativa y complejo amigdalino, y verificado mediante técnicas histoquímicas, tales como transporte retrógrado de algunos colorantes fluorescentes y la degeneración Waleriana anterógrada.

Así, mientras las lesiones en NG y amígdala generan bloqueos en el "aprendizaje" del CAS, la eliminación de las proyecciones amígdalo-corticales, no produce deterioro significativo en el citado aprendizaje, (Lasiter et al. (1983).

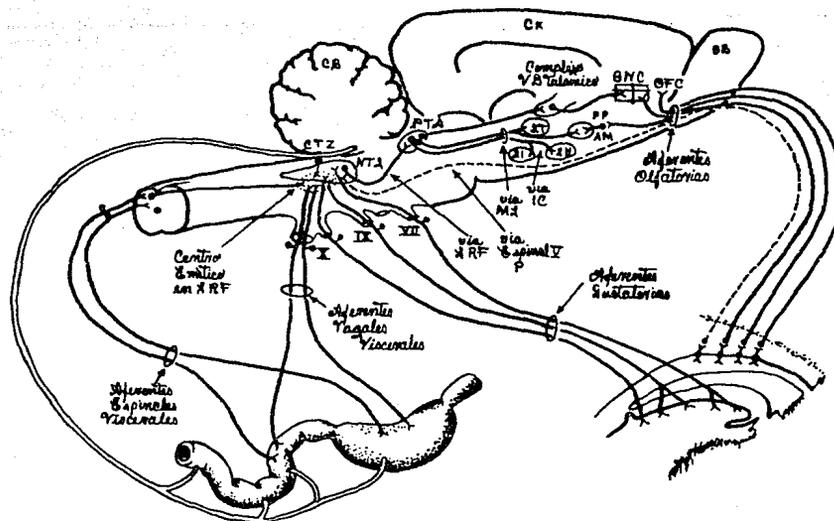


Figura 1. Esquema que muestra la confluencia de vías neurales viscerales y gustativas en la rata. Es posible apreciar la participación de la neocorteza gustativa y el complejo amigdalino, en tales vías. Abreviaturas: (AM) amígdala, (CB) cerebelo, (CTZ) zona de quimiorreceptores, (LRF) formación reticular lateral, (ML) lemnisco medio, (NTS) núcleo del tracto solitario, (OB) bulbo olfatorio, (SI) sustancia innominata, (ST) núcleo subtálmico, (VB) complejo talámico ventrobasal. Tomado de Kiefer, S.W. (1985).

Neuroanatomía de la Neocorteza Gustativa y del Complejo Amigdalino

En concordancia con lo expresado en líneas anteriores, se sabe que la destrucción tanto de la neocorteza gustativa como de los núcleos amigdalinos, elimina la capacidad de asociar el estímulo gustativo con la irritación gástrica, e imposibilita que se establezca el CAS. Debido a esto, y en virtud de que el presente estudio tiene como objeto el estudiar la recuperación anatómica de los trasplantes neocorticales y amigdalinos, habremos de retomar las características neuroanatómicas propias de las citadas estructuras cerebrales.

La Neocorteza Gustativa

Hacia 1960, la convergencia de una serie de evidencias anatómicas electrofisiológicas y conductuales hacían posible la delimitación de un "área cortical gustativa" en la rata, que comprende una región de corteza adyacente al surco rhinal, con dimensiones aproximadas de 1 X 3 mm atravesada por la arteria cerebral media (Benjamin y Akert, 1959; Benjamin y Pfaffmann, 1955), esta porción de la neocorteza gustativa es conocida como el área cortical gustativa somatosensorial. Sin embargo, gracias a los trabajos de Norgren y Wolf (1975); Yamamoto y Kawamura (1972); y Yamamoto et al. (1981), fue posible verificar la existencia de una porción insular de la NG, de manera que hoy en día se sabe que la neocorteza gustativa está formada

fundamentalmente por dos áreas, la somatosensorial y la insular, (fig. 2).

El auge en la investigación sobre el condicionamiento aversivo a los sabores comenzó hace aproximadamente 15 años (Domjan, 1980). El primer estudio de "neocorteza gustativa" en estrecha relación con el CAS fue efectuado por Braun et al. en 1972.

Entre las principales aferencias gustativas que recibe la neocorteza gustativa, figuran las provenientes de: el núcleo parabranquial marginal o área gustativa del puente (Norgren y Wolf, 1975); núcleos del área ventromedial talámica (Lasiter y Glanzman, 1983; Lasiter et al., 1982); y complejo amigdalino (Krettek y Price, 1974, 1977, 1978; Lasiter et al., 1982; Lasiter, 1982).

Norgren y Grill (1976) y más recientemente Saper (1982) y Shipley (1982) han mostrado que las neuronas de la NG insular proyectan axones hacia el complejo parabranquial y la porción caudal del núcleo solitario, lo cual nos habla de que esta corteza insular tiene la posibilidad de modular directamente la actividad de las neuronas de primer orden en las vías gustativas y viscerales.

En resumen, los resultados conductuales e histoquímicos realizados en NG reflejan la presencia de conectividad intrínseca entre la neocorteza gustativa insular y la neocorteza gustativa somatosensorial. Ambas reciben proyecciones talamocorticales pero solamente la porción insular recibe aferentes olfativas directas. Algunas neuronas del fragmento somatosensorial emiten proyecciones hacia la porción insular, en tanto que éste último

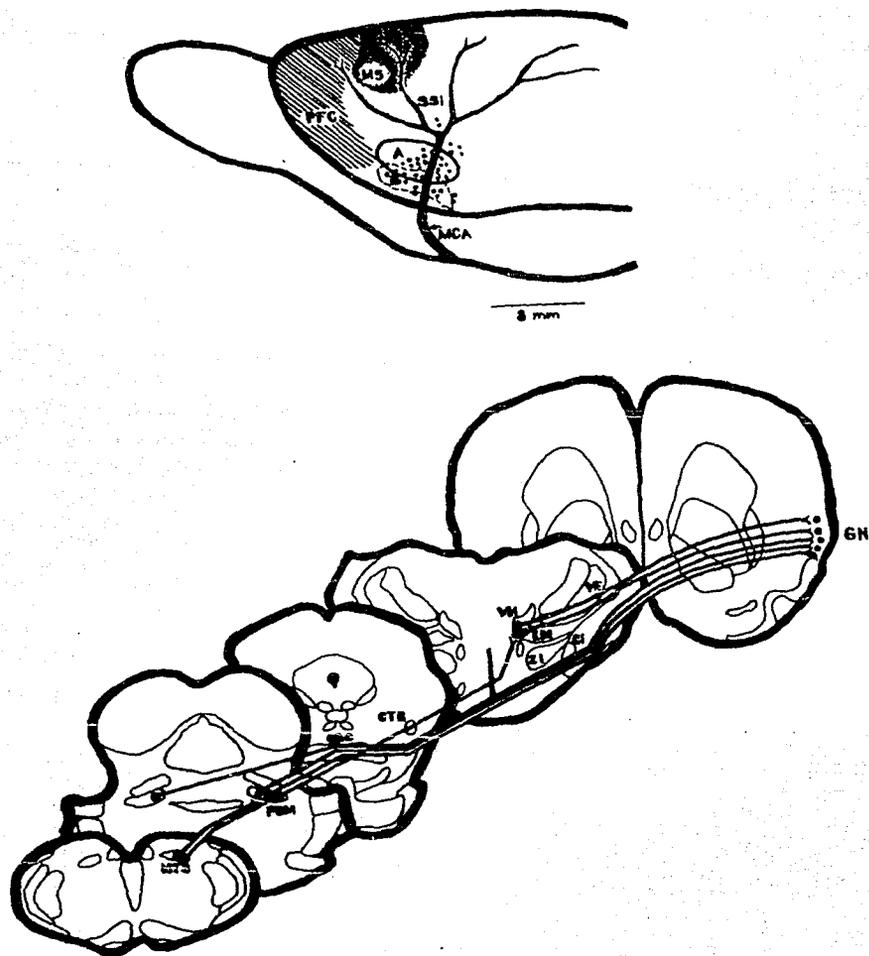


Figura 2. Esquema que muestra la neocorteza gustativa en su porción insular (B) y somatosensorial (A), parte superior. En la porción inferior, es posible observar las inervaciones gustativas que convergen en la neocorteza. Abreviaturas: MS, núcleo del tracto solitario; PBM, núcleo parahraquial medial; DEC, decusación del braquium conjunctivum; CFB, haz tegmental central; VM, núcleo talámico ventromedial posterior; VE, núcleo talámico ventral; IM, lemnisco medio; ZI, zona incerta; CI, cápsula interna; GN, neocorteza gustativa. Esquema superior tomado de Braun, Lasiter y Kiefer, (1982); parte inferior de: Lasiter, Glanzman y Mensah, (1982).

envía axones hacia el núcleo solitario y el complejo parabraquial (Norgren y Grill, 1976; García et al., 1985).

El Complejo Amigdalino

La amígdala es, como su nombre lo indica, una estructura cerebral con forma almendrada, que se ubica entre la cápsula interna y el hipotálamo. Esta estructura posee un atractivo particular debido a la amplia y variada gama de funciones con las cuales se halla involucrada, por ejemplo, estimulación eléctrica de diferentes porciones del complejo amigdalino origina trastornos respiratorios y cardiovasculares, conductas de escape y defensa, salivación, modificaciones de la motilidad gastrointestinal y movimientos masticatorios (Gloor, 1955; 1960).

En armonía con esta aparente complejidad funcional, los estudios sobre la citoarquitectura amigdalina han revelado una manifiesta complejidad estructural debida a la presencia de numerosos núcleos, grupos nucleares y subdivisiones de los mismos, complejidad tal, que se ve incrementada a medida que el complejo amigdalino es analizado mediante las nuevas técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas (Shiosaka et al., 1983), (fig. 3).

El complejo amigdalino se sitúa lateralmente con respecto al hipotálamo y ventralmente en relación al caudado-putamen y al globo pálido. Rostralmente se extiende hasta el nivel del núcleo supraquiasmático y caudalmente hasta el nivel del cuerpo mamilar.

El complejo amigdalino se divide generalmente en dos

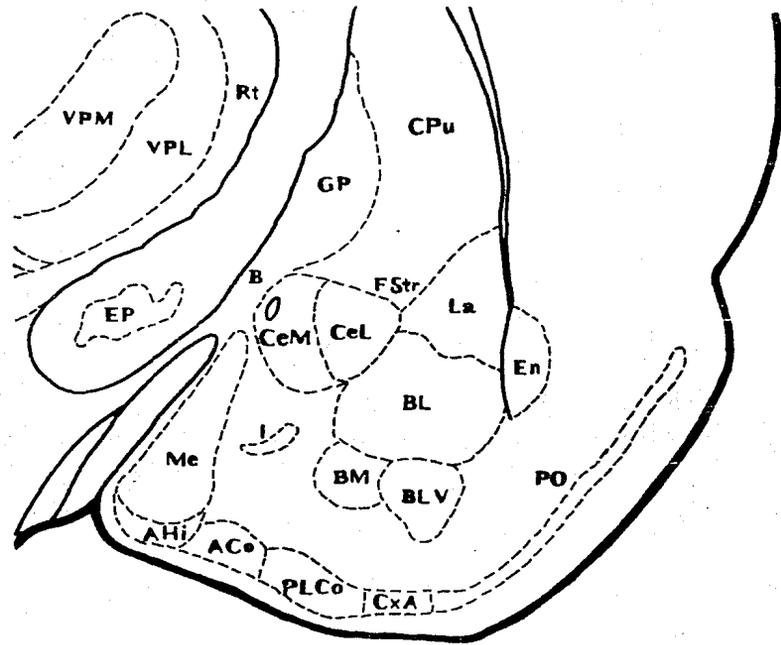
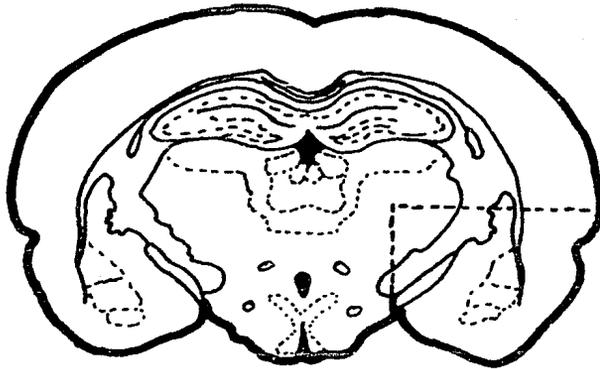


Figura 3. Esquema que muestra la estructura del complejo amigdalino, donde puede apreciarse la ubicación de los núcleos basolateral y lateral. Abreviaciones: BL, núcleo basolateral; En, núcleo endopiriforme; BM, núcleo basomedial; CeL, núcleo central; CeM, núcleo central medial; La, núcleo lateral; l, núcleo intercalar; PO, corteza olfatoria primaria; Me, eminencia media; CPu, caudado putamen. (Paxinos, G. y Watson, Ch., 1982).

masas nucleares principales, un grupo nuclear corticomedia] y un grupo nuclear basolateral] (Crosby y Humphrey, 1941; Gloor, 1960).

Grupo Nuclear Corticomedia]

Este grupo nuclear se halla subdividido en seis áreas nucleares a saber: 1) núcleo amigdalino medial (am); 2) área amigdalohipocampal; 3) núcleo cortical anterior (aco); 4) complejo periamigdalino; 5) núcleo cortical posterior (pco) y 6) núcleo del tracto olfatorio lateral.

Grupo Nuclear Basolateral]

Por su parte, el grupo nuclear basolateral] está integrado por 4 núcleos, que son: 1) núcleo amigdalino lateral (al); 2) núcleo amigdalino basolateral] (abl); 3) núcleo amigdalino basomedial (abm) y 4) núcleo amigdalino central (ac).

Conexiones Eferentes

- Estria Terminal

Este es uno de los dos sistemas mayores de proyección eferente propios del complejo amigdalino. Se ha mostrado que la mayor parte de las fibras que constituyen la estria terminal (St) se originan en la porción corticomedia] del complejo (Fox, 1940). Sin embargo, estudios histoquímicos recientes han revelado que algunas de las fibras en cuestión tienen su origen en otros conglomerados nucleares de la amígdala, tales como: abl, ac, abm, am, pco y del área amigdalohipocampal. La St inerva

principalmente a: el núcleo de la estria terminal (bst), el área septal, el núcleo acumbens y el hipotálamo (Fox, 1940; Krettek y Price 1978; Lammer, 1972).

- Proyección Amigdalofugal Ventral

Las fibras amigdalofugales ventrales tienen su origen en (ab1) y en la corteza piriforme (Cowan et al., 1965; Gloor, 1955). Estas fibras pasan a través de la sustancia innominata y penetran el área preóptica lateral, hipotálamo, núcleo acumbens, área septal, banda diagonal y putamen ventral.

Algunas de las fibras se introducen en el área preóptica y el hipotálamo, arriban al pedúnculo talámico inferior para proyectar hacia la parte magnocelular del núcleo dorsomedial del tálamo (Fox, 1943).

- Conexiones Olfativas

El complejo amigdalino recibe aferencias olfativas substanciales. Sin embargo, existe cierta evidencia en el sentido de que el complejo amigdalino proyecta hacia el bulbo olfatorio (Kvetter y Winans, 1981; Krettek y Price, 1977).

- Proyecciones Amigdalocorticales

Algunos autores han reportado la presencia de proyecciones eferentes desde (ab1) hacia el área prelímbica e infralímbica de la corteza (Krettek y Price, 1977). García et al., en 1985 señalan la existencia de conectividad recíproca entre la neocorteza gustativa insular y el núcleo central de la amígdala. Lasiter (1982) demuestra la presencia de proyecciones amigdalocorticales entre NG y los núcleos lateral y basolateral de la amígdala.

Por su parte, las proyecciones descendentes que parten de núcleo central amigdalino establecen sinapsis con: la parte lateral de sustancia nigra, el área tegmental ventral la formación reticular mesencefálica, la sustancia gris periacueductal, el área parabranchial, el locus ceruleus, el núcleo del tracto solitario, el núcleo motor dorsal del nervio vago y la formación reticular (Krettek y Price, 1978). La mayor parte de estas proyecciones son de naturaleza recíproca (Norgren, 1976; Ottersen, 1981; Saper y Loewy, 1980).

Conexiones Aferentes

- Proyecciones talámicas

Ottersen y Ben-Ari (1979), han reportado que los patrones de proyección precisos parten del tálamo y hacen sinapsis con el complejo amigdalino.

- Proyecciones telencefálicas

Los axones del cuerpo pálido ventral y de la parte ventral del globo pálido terminan en el (al) y (abl); por otra parte, algunos axones originados en la SI arriban a la totalidad del complejo.

- Proyecciones olfativas

Es bien sabido que el complejo amigdalino recibe numerosas fibras aferentes desde el bulbo olfatorio, que dan origen a los sistemas vomeronasal y olfatorio de la amígdala (Kaisman, 1972).

- Conexiones intraamigdalinas

En 1978, Krettek y Price reportaron un estudio detallado sobre las conexiones intrínsecas del complejo. Mostraron que: (al) proyecta hacia abm, ac y corteza periamigdalina; abl hacia ac, núcleo del tracto olfatorio; abm hacia la capa celular de am y

área amigdalohipocampal, corteza periamigdalina y corteza endopiriforme.

Neurotransmisores

En una recopilación realizada por Shiosaka et al. (1983) los autores hacen patente el hecho de que en el complejo amigdalino existe una amplia y variada gama de neuropéptidos cuya ubicación ha sido bien estudiada. Sin embargo, destacan el escaso conocimiento que sobre la ubicación exacta de neurotransmisores como GABA, ACh, catecolaminas (CA), serotonina e histamina; se tiene hoy en día.

Así, mientras se carece de una descripción acerca de la distribución detallada de las terminales GABA-érgicas dentro de la amígdala, se sabe que el complejo amigdalino, posee numerosas terminales catecolaminérgicas tales como la proveniente del locus ceruleus (noradrenérgica) o la que parte del núcleo tegmental dorsal (dopaminérgica).

Wolf y Butcher (1982), señalan la presencia de acetilcolina en el núcleo basolateral amigdalino. En este sentido, resulta interesante hacer énfasis en el hecho de que, dentro del Sistema Límbico, los núcleos central y basolateral de la amígdala, son las estructuras principales que reciben aferencias gustativas (Sarter y Markowitsch, 1985), de manera que la presencia de un alto contenido de acetilcolina en el núcleo basolateral amigdalino, sugiere que este neurotransmisor juega un papel importante en el CAS como lo señalan los trabajos de Bermúdez-Rattoni et al. (1983, 1983), en los cuales, fueron

registradas las modificaciones en el CAS, consecuentes a la aplicación de algunos agonistas y antagonistas de la acetilcolina, tales como fisostigmina y escopolamina.

Neuropéptidos

De manera similar a la riqueza del complejo amigdalino en cuanto a neurotransmisores clásicos se refiere, la presencia de neuropéptidos en esta estructura cerebral, es sin lugar a dudas profusa y variada, como lo revelan los trabajos de Shiosaka et al. (1985).

Así, péptidos tales como somatostatina (SOM), sustancia P (SP), neurotensina (NT), encefalinas (ENK), colecistocinina (CCK), polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), factor liberador de la hormona luteinizante (LHRH), así como oxitocina (OXY) y vasopresina (VP), han sido detectados mediante métodos inmunocitoquímicos, en los diversos núcleos y complejos nucleares que forman parte del complejo amigdalino, principalmente hacia los núcleos basolateral, lateral, central, medial y basomedial (Shiosaka et al., 1983).

Entre los patrones amigdalofugales peptidérgicos, destacan los que hacen su arribo en el área hipotalámica a través de la estria terminalis, los cuales son portadores de SOM, SP, NT, ENK y VIP. En este sentido, es importante tener en mente, el que las conexiones amigdalohipotalámicas se hallan involucradas en la regulación de funciones autónomas, endócrinas y conductuales.

De manera recíproca, el complejo amigdalino, recibe numerosas

aferentes peptidérgicas, portadoras de VP, OXY, LHRH y ACTH, las cuales probablemente se originan en áreas hipotalámicas.

Finalmente, en relación a la presencia de neuropéptidos en el complejo amigdalino, Shiosaka et al. (1983) ponen de manifiesto la naturaleza peptidérgica de algunas conexiones amigdalinas intrínsecas, en las que se hayan involucradas la sustancia P, la neurotensina y la somatostatina.

CAPITULO III

Métodos en el Trazado de Vías Neuronales

Consideraciones Generales.

Existe un buen número de técnicas disponibles para la exploración de la organización del Sistema Nervioso.

Las técnicas más frecuentemente empleadas en el estudio de la anatomía del SNC, pueden ser agrupadas en cuatro categorías principales, (fig. 4).

1) Los métodos pertenecientes a la primera categoría, resultan de especial interés cuando se desea conocer la geometría dendrítica y axonal de las neuronas marcadas y del espacio adyacente a estas (Mugnani, 1985). Incluye a los métodos de tinción de Golgi, los cuales, consisten en fijar pequeñas secciones de SNC en una solución de dicromato de potasio y ácido ósmico, al cabo de un lapso de tiempo variable, el tejido es transferido a una solución diluida de nitrato de plata, finalmente las piezas son cortadas, deshidratadas y montadas en portaobjetos de cristal; esta categoría comprende asimismo a la administración "in vivo" de marcadores. Los métodos de marcadores in vivo son aquellos en los que una substancia como la peroxidasa de rábano, puede ser inyectada en neuronas individuales con el propósito de mostrar el cuerpo neuronal y sus procesos (Kater y Nicholson, 1973).

2) La segunda categoría comprende a los métodos orientados hacia el análisis e interpretación de los cambios degenerativos

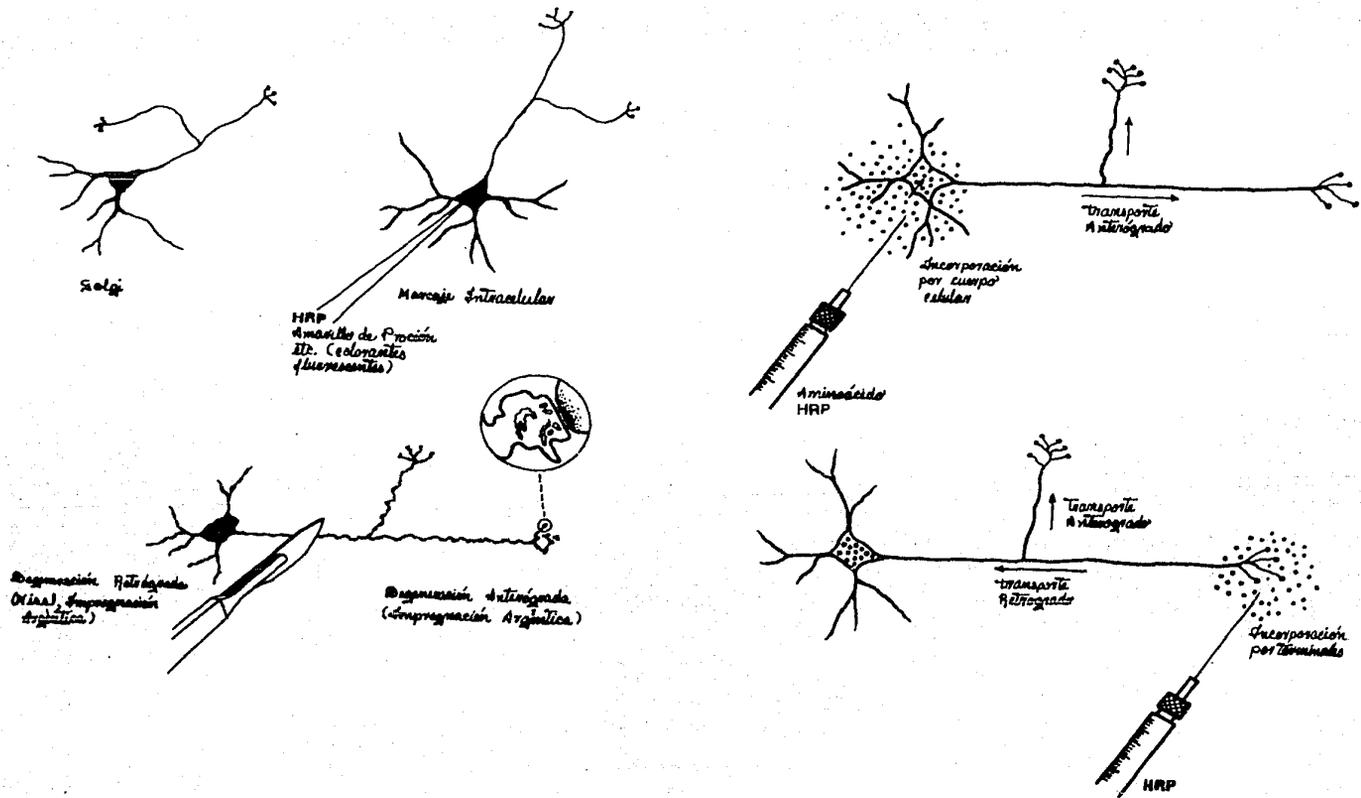


Figura 4. Representación esquemática de algunas técnicas empleadas en el estudio de la anatomía del SNC.

estructurales, que acompañan a los diversos tipos de lesión. Estos métodos pueden ser combinados tanto con microscopía de luz como con microscopía electrónica. Algunos ejemplos clásicos de este tipo de métodos son: el de Nissl para la demostración de cromatólisis en el cuerpo celular neuronal, y el de Marchi con el que se tiñen las vainas de mielina en proceso de desintegración. Sin embargo, estos métodos pueden ser superados por las nuevas modalidades de las técnicas de impregnación argéntica en axones y terminales axónicas degeneradas.

3) La tercera categoría incluye los métodos de trazado de vías en los cuales, tras la incorporación de algunas sustancias como colorantes fluorescentes, enzimas exógenas, moléculas marcadas radioactivamente, etc., es posible detectar su transporte y subsecuente localización en diferentes regiones neuronales (Mesulam, 1979).

4) Varios métodos histoquímicos han sido empleados en el mapeo de patrones nerviosos. Ejemplos de estos son: el método de histofluorescencia con monoaminas; las técnicas inmunohistoquímicas recientemente desarrolladas para la identificación de diversas sustancias neurotransmisoras y el método de Timm para la demostración de metales; (Danscher y Zimmer, 1978).

En seguida describiremos con mayor detalle el método de la peroxidasa de rábano, empleado en el presente estudio, el cual, ha sido ampliamente utilizado en la exploración de la organización estructural del SNC.

PEROXIDASA DE RABANO

La enzima peroxidasa de rábano (HRP), posee sin lugar a dudas un amplia gama de aplicaciones en el trazado de vías neurales. Pese a que la membrana plasmática, constituye una efectiva barrera para su libre difusión en células intactas, la HRP es capaz de penetrar al interior de las neuronas a través de procesos endocíticos (Mesulam, 1982).

Más de un siglo habría de transcurrir entre el descubrimiento de la peroxidasa y su aplicación como trazador neuronal. La primera descripción de la actividad de la peroxidasa se remonta hacia 1855, cuando Schoenbein encontró que los extractos de algunos hongos y otros tejidos en presencia de peróxido de hidrógeno o simplemente al contacto con el aire viraban el color de algunas soluciones (Paul, 1963).

El aislamiento y eventual purificación de la peroxidasa de rábano fue efectuada por Wilstatter y colaboradores entre 1917 y 1924 (Keilin y Hartrée, 1951), mientras que su cristalización fue reportada por Theorell en 1942. Sin embargo, no fue sino hacia la década de 1960 y 1970, que la utilización de HRP por neurofisiólogos y neuroanatomistas, registra un considerable auge. Así, tras la introducción del uso del transporte axonal retrógrado de trazadores macromoleculares, particularmente de HRP, esta enzima se ha consolidado como un método sensible y confiable en la identificación de cuerpos celulares que dan origen a proyecciones de fibras hacia un sitio dado dentro del sistema nervioso (La Vail, 1975; Jones, 1975; Kristensson y

Olson, 1971; La Vail y La Vail, 1972).

La subsecuente demostración de que la HRP es transportada por los axones en dirección anterógrada (Hansson, 1973; Mesulam y Mufson, 1980) ha permitido la expansión de las aplicaciones potenciales de esta técnica, en el contexto de los trazadores macromoleculares.

Aplicaciones Básicas

El método HRP presenta tres aplicaciones potenciales básicas:

1) Determinación de Proyecciones Aferentes

La administración de HRP en alguna región del SN poseedora de terminales axónicas, conlleva la incorporación y subsecuente transporte retrógrado del trazador, hacia los cuerpos neuronales.

El empleo de métodos histoquímicos altamente sensibles puede revelar la extensión total de una neurona marcada, incluyendo su árbol dendrítico y colaterales axónicas. La aplicación de HRP puede ser combinada con la aplicación de un segundo marcador, por ejemplo algún compuesto fluorescente o un marcador radioactivo, con el fin de determinar la presencia de proyecciones colaterales por doble marcaje retrógrado.

2) Determinación de Proyecciones Eferentes

La peroxidasa inoculada dentro de la materia gris, es susceptible de ser incorporada por los somas neurales. Estas neuronas transportarán el material ortógradamente a través del axón hacia su terminal sináptica, sin embargo, este transporte

anterógrado de HRP puede ser visualizado solamente a través de métodos histoquímicos de alta sensibilidad, particularmente con la ayuda de microscopía electrónica (fig. 5).

3) Si el tiempo de supervivencia post-administración de HRP es de unos cuantos minutos o pocas horas, es posible lograr impregnaciones de cuerpos celulares, árboles dendríticos y axones ubicados en torno al sitio de inoculación, con lo que se logra una definición óptima de las estructuras marcadas comparable a la obtenida mediante las técnicas de Golgi (Hedreen y McGrauth, 1977; Keefer, 1978). Más aún, como un refinamiento de esta aplicación, la HRP puede ser aplicada intracelularmente (Scalia y Colman, 1974).

Características de la Peroxidasa de Rábano

La peroxidasa de rábano se encuentra, como su nombre lo indica en el rábano común (Cochlearia armoracia), aunque algunas isoenzimas han sido detectadas en el camote, el germen de trigo y algunas levaduras.

El P.M. de la HRP es aproximadamente de 40,000 (39,800 a 44,100) daltons, su diámetro molecular es de 4.74 nm con un radio de hidratación de 0.3 nm (Renneke y Venkatalacham, 1979). Está considerada dentro del grupo de las glicoproteínas que contienen un grupo hemo (Straus, 1964).

En presencia de su sustrato, peróxido de hidrógeno, la HRP es capaz de catalizar la oxidación de ciertos compuestos denominados

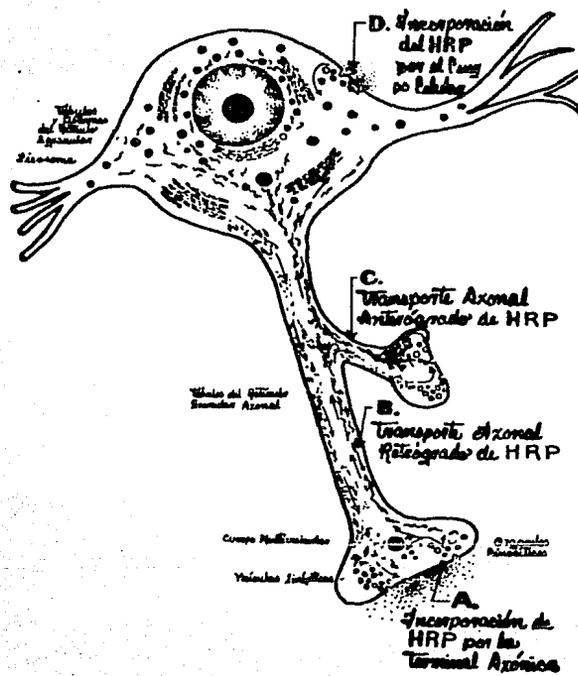
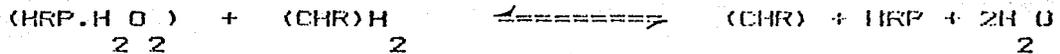
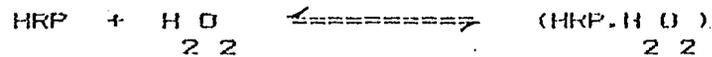


Figura 5. Representación esquemática de una neurona, en la que es posible apreciar, la incorporación y transporte de la peroxidasa de rábano (HRP) tomada de Mesulam (1982).

cromógenos (CHR), originando así un producto de reacción visible.



La membrana plasmática, constituye una barrera efectiva para la libre difusión de la HRP en células intactas, por tanto esta enzima penetra al interior celular por un proceso de endocitosis, que tiene lugar a nivel de dendritas, terminales axónicas y aún en el soma neuronal. Las vesículas endocíticas que transportan a la peroxidasa miden aproximadamente 100 nm y viajan vía plasmalema a una velocidad promedio de 84 a 113 mm/día en transporte retrógrado y 228 a 432 mm/día en forma anterógrada (Mesulam, 1982).

Existe un lapso de aproximadamente 15 minutos, entre el momento de la aplicación y el inicio de la endocitosis. Es además necesario considerar el tiempo de acumulación de la enzima a fin de detectarla adecuadamente, así, en consideración a todos estos factores el tiempo de supervivencia óptimo para estudios efectuados en SNC, oscila entre las 24 y 72 hrs. El máximo tiempo de sobrevivencia registrado oscila entre los 5 y 7 días, al cabo de los cuales, se detecta un severo efecto degradativo y de exocitosis enzimáticos (Mesulam, 1982).

La aplicación directa de peroxidasa en el cerebro da lugar a zonas de administración que alcanzan extensiones que varían entre menos de 1 mm a algunos mm, que dependen de la cantidad inyectada, la velocidad de administración así como de la extensión del daño mecánico (Kim y Strick, 1976; Vanegas, et al., 1978). La zona de difusión visible, se expande durante las horas siguientes a la aplicación.

Phillipson en 1979, encontró que tras la administración iontoforética de HRP el sitio de aplicación alcanzaba su máxima extensión hacia las 4 hrs y disminuía hasta un tercio de su diámetro después de 24 horas.

El aspecto típico de un sitio de administración consiste en una región central, en la cual todos los elementos tisulares aparecen impregnados de HRP, rodeada por un "halo", en el que el marcaje se hace progresivamente débil a medida que se incrementa la distancia respecto al centro.

Proceso de Incorporación de la HRP

Cuando la administración de peroxidasa se efectúa con lesión mínima del tejido, la enzima es incorporada principalmente por terminales sinápticas (Turner y Harris, 1974), incluyendo terminales periféricas de células ganglionares sensoriales (Arvidson, 1975). Los estudios con microscopía electrónica han mostrado que tras su administración, la peroxidasa aparece sucesivamente en vesículas pinocíticas, sacos membranosos, túbulos y cuerpos densos multivesiculados. Después de largos periodos post-inoculación; la HRP desaparece

de estos elementos en la misma secuencia, esto sugiere que los estados de incorporación, empaquetamiento y degradación lisosomal del trazador, involucra, a los citados organelos.

La incorporación de HRP por las terminales, se haya acoplada directamente a la actividad sináptica de las neuronas en cuestión (Heuser y Reese, 1975; Holtzman, 1977), en consecuencia, la incorporación de HRP se reduce sustancialmente por la inhibición de la actividad sináptica provocada, ya sea por la aplicación de pentobarbital, (Turner, 1977; Mesulam y Mufson, 1980) o bien, por la remoción de aferentes excitatorias de estas neuronas (Singer et al., 1977). En contraste, la incorporación registra incrementos notorios si la actividad sináptica es estimulada por cualquier medio.

Kristensson y Sjostrand en 1972, demostraron que las células en fase de crecimiento, ya fuese en un animal juvenil o en un experimento de reinervación por regeneración, incorporan peroxidasa con mayor eficiencia. La Vail y La Vail (1972) así como Walberg et al (1976), mostraron resultados similares en fenómenos de rebrote axonal.

El transporte anterógrado de HRP, tiene lugar a través de sacos, túbulos y vesículas hasta su arribo al cuerpo celular, donde la enzima es acumulada en la región perinuclear en estrecha asociación con el complejo de Golgi. La incorporación directa de HRP por el soma neuronal ocurre también exclusivamente cerca de los sitios de inyección o bien, en regiones en las que las neuronas son expuestas a altas concentraciones del trazador.

Los organelos pinocíticos involucrados en la incorporación de HRP son similares a aquellos de las terminales axónicas (Heimer y Robards, 1982).

Finalmente en cuanto al transporte transneuronal de la peroxidasa, este no ha sido plenamente comprobado, puesto que en numerosos estudios efectuados a nivel de microscopía de luz, no ha sido posible detectar la exocitosis del trazador (Mesulam, 1982).

Variantes Metodológicas

Existen en principio, tres diferentes modalidades disponibles para el estudio del transporte de HRP. La primera posibilidad consiste en marcar la peroxidasa o su apoenzima con un isótopo radioactivo, como el tritio y estudiar su localización dentro del sistema nervioso con técnicas autorradiográficas. La segunda alternativa comprende la combinación de la peroxidasa con técnicas inmunocitoquímicas mediante la formación de complejos HRP - anti HRP (Vacca et al., 1975). El tercer procedimiento que es por cierto el de empleo más generalizado, se basa en la reacción enzimática oxidante del trazador. Para producir esta reacción, el tejido es incubado en un medio que contiene peróxido de hidrógeno y un cromógeno, usualmente un derivado de benzidina, el cual es oxidado a un producto coloreado por un sistema peróxido-peroxidasa. Algunos de estos cromógenos son: el 3,3' - tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB), el dihidrocloruro de benzidina (BDHC) y la 3,3',5,5' - tetrametil -- benzidina (TMB). Desafortunadamente, la benzidina y sus derivados son generalmente

carcinogénicos por lo que su manejo requiere precauciones extremas.

Pese a que la TMB está considerada como uno de los derivados benzidínicos menos nocivos, se recomienda extremar precauciones al trabajar con dicha sustancia (Holland et al., 1974). Aunado a su bajo potencial carcinogénico, la TMB presenta una alta sensibilidad, por lo que este cromógeno, es hoy por hoy el más recomendable (Mesulam, 1982), (tabla 1).

Es importante destacar, que el grosor de los cortes procesados se relaciona estrechamente con la capacidad de regeneración de los diferentes cromógenos, así, mientras para la BDHC, se recomienda un grosor de 30 a 35 micras para la TMB los cortes pueden alcanzar grosores hasta de 50 micras (Mesulam, 1982).

Generalidades Sobre la HRP

El tiempo óptimo de sobrevida post-administración, depende de la tasa de transporte axonal de HRP, de la longitud del sistema de fibras estudiado así como de la tasa de degradación lisosomal una vez que el trazador ha llegado al soma neuronal. Influyen asimismo, la densidad de la arborización terminal en la zona de aplicación (Jones, 1975) y probablemente el diámetro del axón transportador de HRP (Nauta et al., 1975; Jones et al., 1977).

Debido a que la peroxidasa de rábano no ha sido extensamente utilizada como un trazador anterógrado, la información respecto al efecto de los diversos tiempos de sobrevida sobre el marcaje de campos sinápticos es limitada. El consenso parece ser, que el

	Sitio de admón. de HRP	Zona de detección	Núm. de cortes analizados	TMB	DAB	BDHC
Caso 1	Hipocampo Y Neocorteza	Claust (ipsi)	4	72	1	1
Caso 2	Bulbo Olfatorio	AHR (ipsi) NLOT (ipsi)	3 2	164 22	8 0	1 0

Tabla 1. Tabla comparativa de la eficiencia en el marcaje de vías neurales, a través del empleo de varios cromógenos. Abreviaturas anatómicas: Claust, claustrum; AHR, rudimento hipocampal anterior; NLOT, núcleo del tracto olfatorio lateral; ipsi, ipsilateral. Tomado de Mesulam, M. (1982).

transporte anterógrado de HRP está relacionado con el flujo axoplásmico rápido (Hanson, 1973; Scalia y Colman, 1974; Sotelo y Riche, 1974; Colman et al., 1976). En refuerzo de esta idea, Mesulam y Mufson en 1980 determinaron que en los axones de células ganglionares retinales de rata, la tasa de transporte anterógrado de HRP es aproximadamente de 300 mm/día.

Finalmente y en relación a la potenciación de la incorporación y el transporte de HRP es pertinente mencionar que han sido desarrollados varios procedimientos con el fin de incrementar la efectividad del método de HRP. El más sencillo consiste en añadir a la solución de HRP alguna sustancia que sea capaz de efectuar transporte somatofugal o somatopetal, ejemplos de este tipo de sustancias son el dimetilsulfóxido (DMSO) y la poli-L-ornitina (ORN). Otra alternativa, utilizada para la dirección retrógrada de transporte, se basa en la eliminación de otras proyecciones aferentes al sitio de administración. Mediante este recurso, Siegel et al. (1977), incrementaron notablemente el trazado de las proyecciones amigdalinas al núcleo talámico medio-dorsal, al hacer lesiones en corteza prefrontal una semana antes de aplicar la HRP.

Ventajas y Limitaciones de la Técnica

Una gran ventaja de la peroxidasa de rábano radica en su efectividad para localizar somas de origen con gran especificidad entre una población mezclada de neuronas. Aunado a lo anterior, las innovaciones metodológicas efectuadas a la técnica de HRP en años recientes, han permitido que la sensibilidad alcanzada por ésta, sea comparable a la registrada por los métodos autorradiográficos, con la ventaja de que el tiempo invertido en el procesamiento mediante peroxidasa es considerablemente menor.

La técnica de HRP constituye una herramienta de gran utilidad en el trazado de proyecciones colaterales.

Si se emplea a la DAB como cromógeno, los productos de reacción de HRP son osmiofílicos, por lo que pueden ser empleados en estudios de microscopía electrónica. La alta definición de somas y dendritas que se obtiene mediante esta técnica, no sólo por la inoculación intracelular de HRP sino también a través de administraciones extracelulares, constituye una potencialidad de este trazador que hasta hoy en día no ha sido explotada en toda su extensión.

En contraste con estas ventajas es necesario considerar que la utilización de la peroxidasa de rábano como trazador conlleva algunos problemas.

La HRP puede ser transportada por fibras de paso dañadas durante la inoculación. La incorporación de peroxidasa es dependiente de la concentración del trazador así como del estado funcional de las neuronas, en consecuencia la depresión

de la actividad neural, debida a la acción de algún fármaco disminuye la eficiencia de incorporación de HRP, además de que varios de los cromógenos de uso regular son carcinogénicos (Mesulam, 1982).

CAPITULO IV

Planteamiento de Objetivos.

En estudios previos efectuados en nuestro laboratorio, se ha demostrado la recuperación funcional de la neocorteza gustativa por medio de trasplantes de tejido nervioso fetal, mediante el empleo del modelo conductual de Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS), Bermúdez-Rattoni et al. (1987). Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos, muestran claramente, que las lesiones de la corteza gustativa y del complejo amigdalino producen bloqueos en la adquisición del CAS, lo cual confirma los hallazgos de otros autores (Aggleton et al., 1981; Bermúdez-Rattoni et al., 1986; Lasiter et al., 1985). Asimismo, los resultados muestran que los trasplantes corticales produjeron una recuperación significativa de las deficiencias en la adquisición de la conducta. Por su parte, tanto los sujetos con trasplantes amigdalinos como los sujetos con lesión en la amígdala presentaron recuperación conductual, es decir, que los sujetos con lesión amigdalina, exhibieron recuperación espontánea (fig. 6). Así pues, estos experimentos no solo respaldan la hipótesis de que los trasplantes cerebrales fetales son capaces de restaurar funciones cognitivas, sino que también destacan la existencia de diferencias funcionales fundamentales, entre la neocorteza gustativa y la amígdala, en cuanto a la regulación de los procesos involucrados en la adquisición y retención de la aversión a los sabores (Bermúdez-Rattoni et al., 1987).

A la luz de estos resultados, la pregunta a resolver, era la

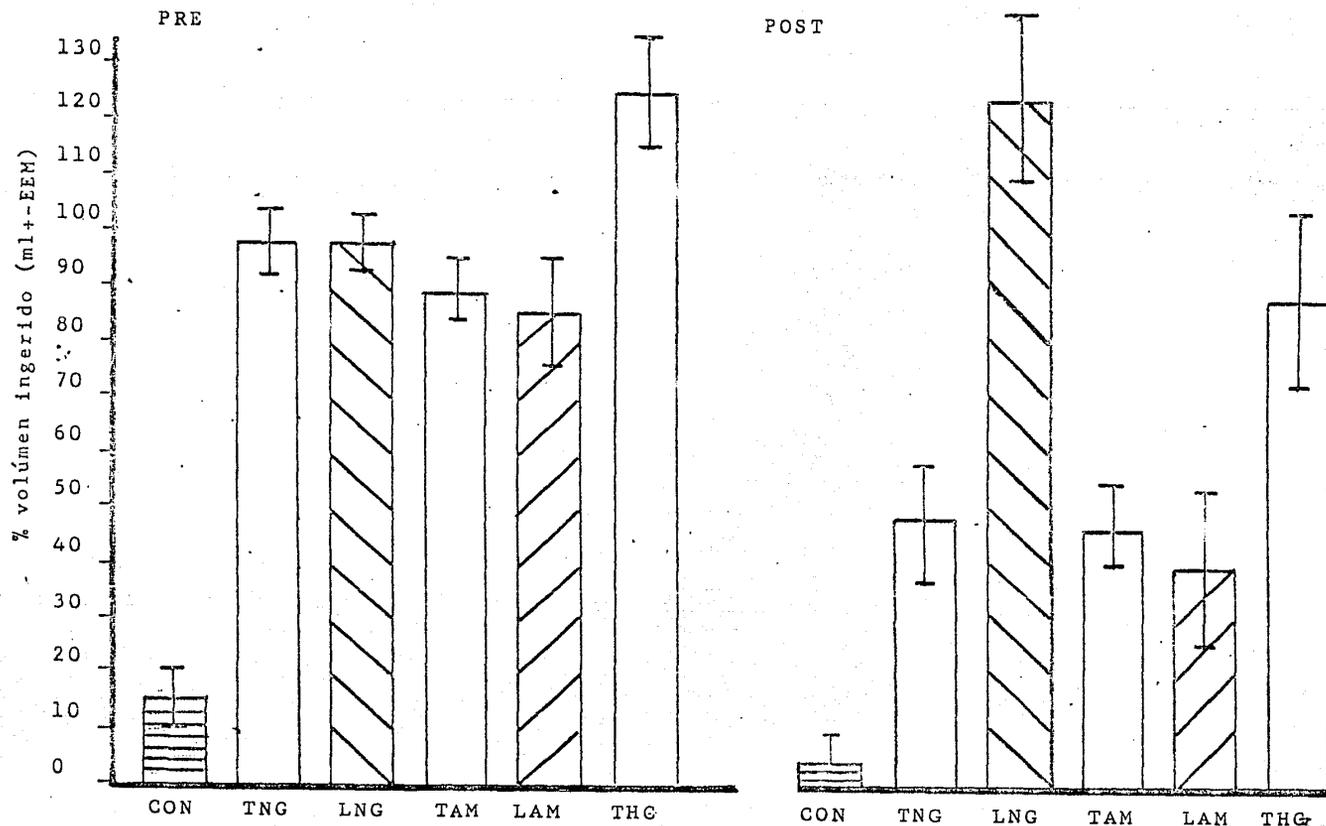


Figura 6. Gráfica que representa los niveles de consumo (en porcentaje de volúmen ingerido respecto a su línea base), de los grupos control, lesionados e implantados; durante la primera prueba pre y post trasplante. (TNG: grupo con trasplante cortical homotópico; THG grupo con trasplante cortical heterotópico; LNG: grupo con lesión en neocorteza gustativa; LAM: grupo con trasplante amigdalino homotópico; LAM: grupo con lesión en amígdala y CON: grupo control).

relacionada con el grado de integración neuroanatómica de los trasplantes y con el papel que juega esta integración en la recuperación funcional de los sujetos.

En el presente estudio, nuestro objetivo fué el de abordar la primera parte de la pregunta anterior, es decir, la relacionada con el grado de integración anatómica del trasplante con el tejido huésped. En consecuencia, era necesario:

a) Conocer la potencialidad de los trasplantes cerebrales fetales para reinervar algunas regiones del cerebro huésped de sujetos adultos

a.1) Identificar qué regiones cerebrales se hallaban involucradas en la interconexión trasplante-huésped

a.2) Verificar si tales regiones correspondían a las que normalmente son inervadas por la neocorteza gustativa y/o por el complejo amigdalino

a.3) Conocer la densidad poblacional y la distribución topográfica de las neuronas implantadas, que participaban en la reinervación

b) Conocer, si a su vez el implante, recibía aferencias provenientes del tejido huésped

c) Indagar acerca de la existencia de diferencias, en cuanto a la potencialidad de inervación, entre los trasplantes neocorticales y los amigdalinos

d) Analizar las diferencias en cuanto a la integración neuroanatómica de los trasplantes, inherentes a la naturaleza de los mismos, es decir, entre trasplantes homotópicos y heterotópicos

d.1) Relacionar la importancia de la integración citoarquitectónica con el grado de reinervación de los tejidos transplantados

Todo ello, en transplantes con una madurez de 8 semanas, similares a los analizados durante la fase conductual de nuestros experimentos.

Así, con el objeto de analizar la dinámica de los procesos de reinervación, decidimos emplear la peroxidasa de rábano, considerando las características propias de esta técnica de trazado de vías neuronales.

CAPITULO V

Procedimiento

a) Sujetos

Los sujetos empleados en este estudio, fueron ratas machos de la variedad Wistar, con pesos entre 250 - 300 g divididos al azar en 5 grupos:

GRUPOS CONTROL

Grupo control I (n = 3): Sin lesión ni transplante, con administración de trazador neural en neocorteza gustativa (NG)

Grupo control II (n = 3): Sin lesión ni transplante, con administración de trazador neural en el complejo amigdalino (AMX)

GRUPOS EXPERIMENTALES

Grupo experimental I (n = 5): Con transplante homotópico en neocorteza gustativa (NG-NG)

Grupo experimental II (n = 3): Con transplante heterotópico en neocorteza gustativa (Tectum-NG)

Grupo experimental III (n = 4): Con transplante homotópico en complejo amigdalino (AMX-AMX)

b) Lesión y Transplante

Con el fin de analizar las conexiones que establece el transplante con diferentes estructuras cerebrales del huésped fue empleada la peroxidasa de rábano (HRP), para lo cual los sujetos fueron lesionados y transplantados de acuerdo a las siguientes indicaciones.

Los tres grupos experimentales fueron lesionados electrolítica y unilateralmente mediante técnicas estereotáxicas convencionales. Los electrodos fueron construidos con barras aisladas de acero inoxidable, excepto en la porción apical (0.5mm aproximadamente) y conectados a un estimulador que permitió el paso de una corriente de 2 mAmp durante un minuto.

Las coordenadas empleadas durante la cirugía de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1982) fueron las siguientes: Neocorteza gustativa (AP = +1.2; L = +5; H = -5) y complejo amigdalino (AP = -2.5; L = +4.5; H = -7.5).

Una semana después de practicada la lesión, los sujetos recibieron transplante unilateral de tejido cerebral procedente de fetos de 17 días de gestación. El grupo experimental I recibió transplante de tejido homotópico de neocorteza gustativa; el grupo experimental II recibió transplante de tejido del tallo cerebral (tejido heterotópico), y finalmente el grupo experimental III fue el receptor de tejido homotópico amigdalino.

Durante la cirugía del transplante, una vez seccionado el tejido cerebral correspondiente, éste se introdujo en una microjeringa Hamilton de 100 microlitros previamente acoplada a un aparato estereotáxico, con el fin de depositar el tejido en el

lugar exacto dentro del cerebro del huésped.

Una vez concluida la operación, los animales permanecieron en recuperación por un lapso de 8 semanas, al cabo de las cuales fueron sometidos al procedimiento correspondiente a la administración y ulterior detección de la HRP.

Durante los procesos quirúrgicos de lesión y trasplante, los sujetos fueron anestesiados con pentobarbital (Nembutal) 50 mg/kg.

c) Histoquímica

c.1) Administración del trazador

Los sujetos experimentales recibieron aplicaciones de peroxidasa de rábano HRP, de acuerdo a la técnica de Mesulam (1982). Tanto el grupo experimental I como el II recibieron HRP en el complejo amigdalino, mientras el grupo experimental III, la recibió en neocorteza gustativa; para tal efecto:

- Los sujetos fueron anestesiados con hidrato de cloral al 10% (400 mg/kg de peso).
- Posteriormente fueron inyectados estereotáxicamente con 0.5 μ l de una solución de HRP (Sigma VI) y verde rápido al 2% (0.4 mg/10 l) a una velocidad de 0.5 μ l/25 min, por medio de una microjeringa Hamilton de 1/1, la aguja se mantuvo en su sitio durante 10 minutos después de la administración, fig. 7.

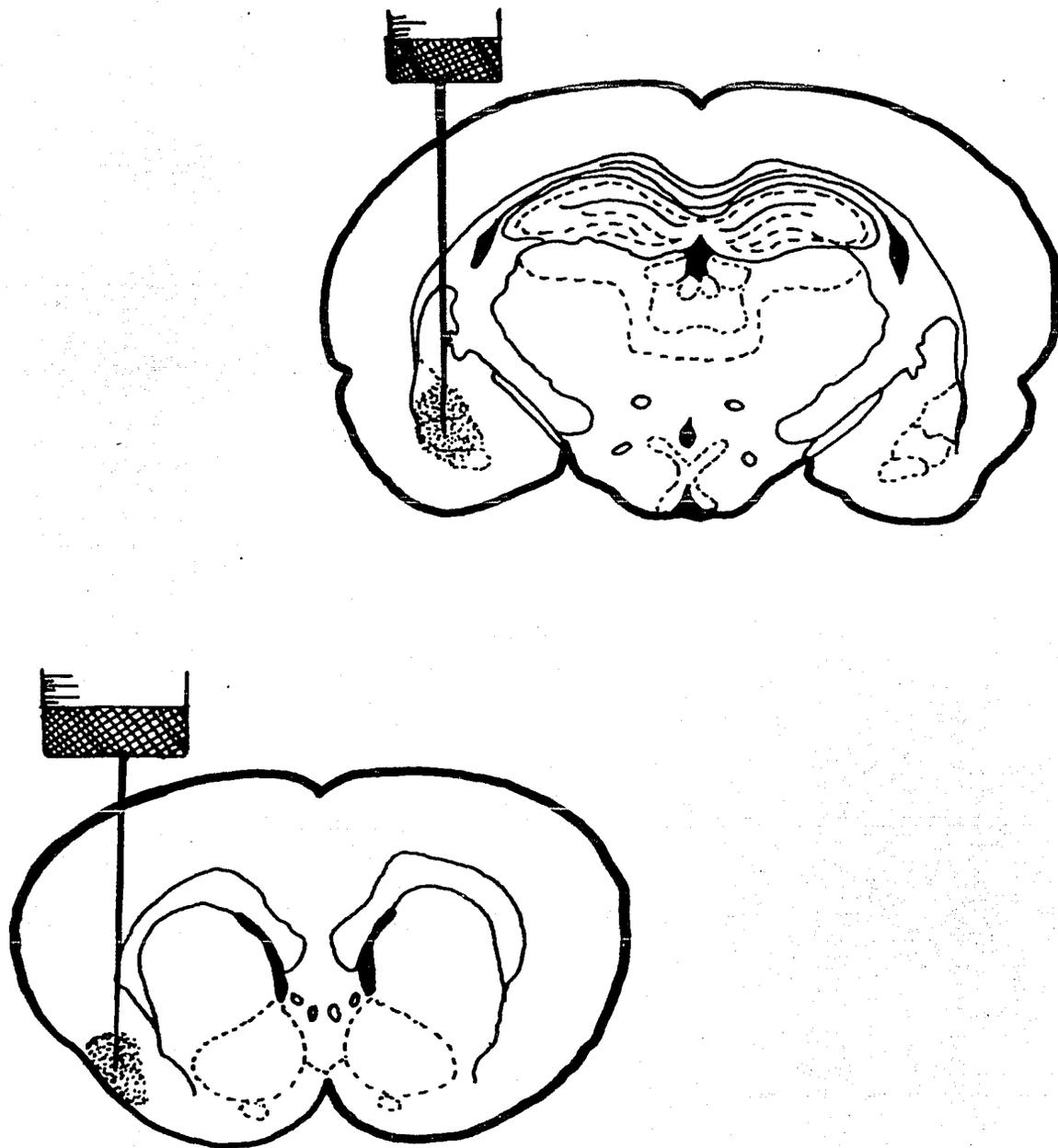


Figura 7. Esquema que ilustra el procedimiento de administración mecánica de la peroxidasa de rábano, en el complejo amigdalino y la neocorteza gustativa. La aplicación de la HRP se efectuó a través de una jeringa Hamilton de 100 μ l, acoplada a un aparato estereotáxico.

c.2) Fijación y Corte

- Se procedió a la perfusión intracardial 26 horas más tarde empleando:

i) solución salina 0.9% + 250 UI de heparina (250 ml/5min)

ii) solución fijadora de glutaraldehído 1.25% y paraformaldehído 1%, en buffer fosfato 0.2 M, pH = 7.4 (500 ml/30min).

iii) solución lavadora de buffer fosfato 0.2 M + sacarosa 5%, pH = 7.4, a 4 C (500ml/30min)

- Posteriormente, se procedió a la extracción de los cerebros, los cuales fueron almacenados en una solución de buffer fosfato 0.1 M + sacarosa 30%, por espacio de 24 hrs.

- Finalmente, los cerebros fueron cortados empleando un microtomo de congelación, las secciones (60 μ m) fueron recogidas en buffer de fosfato 0.1 M.

c.3) Detección del trazador

La detección de la HRP se efectuó a través de su actividad enzimática oxidante sobre la TMB, durante la incubación de las secciones de cerebro, de acuerdo al siguiente procedimiento.

Las secciones fueron transferidas a través de 6 cambios de agua destilada y desionizada a una temperatura 40° C (1min/cambio); posteriormente fueron transferidas a la solución (A + B)*, donde permanecieron durante 25 min; al término de los cuales se añadieron 4 ml de peróxido de hidrógeno 0.3% (25 min).

* Soluciones A y B (Ver pág. siguiente)

Finalmente se efectuaron 6 baños de 5 min en solución de buffer de acetato pH 3.3 y agua destilada al 5%, y se procedió al montaje de las secciones en portaobjetos impregnados previamente con gelatina. Después de 24 horas las laminillas fueron teñidas con tionina, de acuerdo al tren de tinción que describimos a continuación: tionina a una temperatura de 20°C, durante 60 segundos; agua destilada (breve lavado); alcoholes graduales al 50%, 70%, 95% y 100% (20 segundos en cada cambio); mezcla de xileno y alfa terpenol en proporción de 1:1 (al paso).

* Sol A

92.5 ml de agua destilada

5.0 ml de acetato buffer

0.5 g de gelatina

100.0 mg de nitroprusiato de sodio

* Sol B

1.0 ml de alcohol etílico

5.0 mg de tetrametilbencidina

Las secciones fueron analizadas y fotografiadas en campo claro y oscuro utilizando un microscopio POLYVAR.

Con el fin de circunscribir el área de aplicación de la peroxidasa, en una segunda fase del experimento, se practicó la administración iontoforética de HRP marcada con lecitina de

germen de trigo (HRP-WGA) y verde rápido al 2% (0.5 mg HRP-WGA/20^µ l de verde rápido), mediante el paso de una corriente positiva directa de 4^µ Amp durante 10 minutos. La micropipeta empleada tenía un diámetro en la punta de 12^µ m. Una vez efectuada la aplicación, la micropipeta permaneció dentro del sitio de administración durante 10 minutos; el ulterior procesamiento de los cerebros se efectuó siguiendo los lineamientos ya descritos.

Resultados y Discusión Parcial

En sujetos control, procesados mediante la técnica de peroxidasa de rábano, se hizo evidente la presencia de conexiones neurales recíprocas entre la neocorteza gustativa (áreas 13 y 14 de Krieg) y la región amigdalina, principalmente correspondiente a los núcleos basolateral y lateral (fig. 8), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Lasiter y col. en 1982.

En el caso del grupo control I, en el cual la peroxidasa fue aplicada en la neocorteza gustativa, los sitios de administración en todos los sujetos, mostraron una apariencia característica, consistente en una región central en la cual todos los elementos tisulares aparecen impregnados de HRP, rodeada por un halo, en el que el marcaje se hace progresivamente débil a medida que se incrementa la distancia respecto al centro, tal como ha sido descrito por Vanegas et al., en 1978, (fig. 8D). En este grupo, la detección de somas marcadas con HRP, a través de transporte retrógrado, se efectuó en el complejo amigdalino, fundamentalmente en los núcleos lateral y basolateral (fig. 8 B y C), en los cuales se registró una alta densidad de neuronas marcadas por la enzima, haciendo posible la observación del núcleo basolateral, caracterizado por la presencia de neuronas grandes, que según (Shiosaka et al., 1983), son las más grandes del complejo amigdalino.

Un fenómeno similar se detectó en los núcleos ventromedial y ventroposteromedial talámicos (fig. 9), en concordancia con lo obtenido por Lasiter et al., (1982), ambos núcleos talámicos, mostraron una alta densidad neuronal correspondiente a la

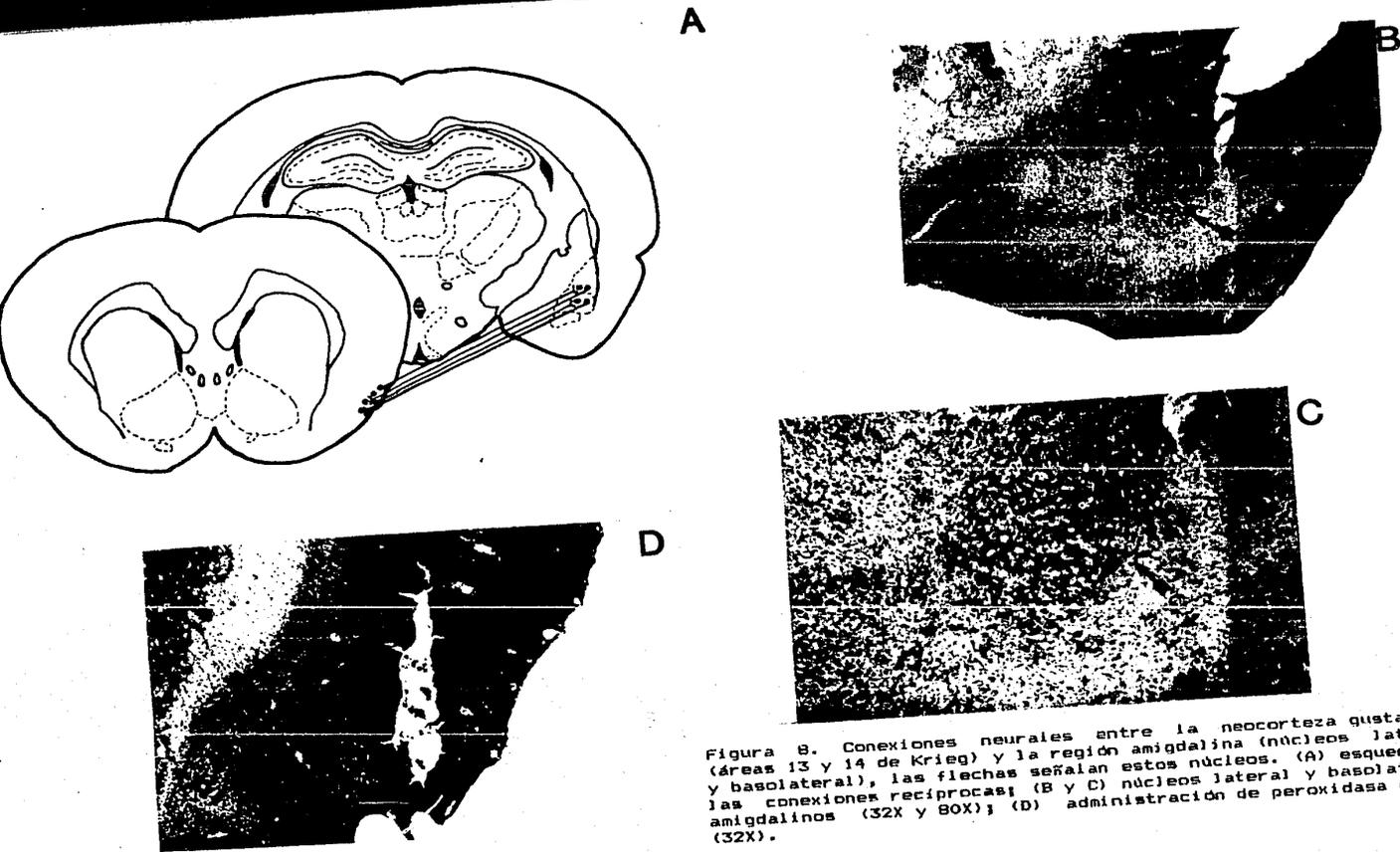


Figura 8. Conexiones neurales entre la neocorteza gustativa (áreas 13 y 14 de Krieg) y la región amigdalina (núcleos lateral y basolateral), las flechas señalan estos núcleos. (A) esquema de las conexiones recíprocas; (B y C) núcleos lateral y basolateral amigdalinos (32X y 80X); (D) administración de peroxidasa en NG (32X).

población marcada por HRP. Tanto en el caso de los núcleos talámicos, como en el correspondiente al complejo amigdalino, la detección de neuronas marcadas se efectuó de manera ipsilateral al sitio de administración. La ubicación de las vesículas de peroxidasa al interior de los somas neuronales, mostró una distribución homogénea en el pericarion, bordeando el núcleo celular, sin penetrar en éste, tal como lo describe Mesulam (1982).

Por su parte el grupo control II, en el cual la peroxidasa fue administrada en el complejo amigdalino, fue observada una ubicación adecuada de la aplicación, con las características descritas en líneas anteriores. En este grupo, la detección de neuronas marcadas con HRP, a través de transporte retrógrado de la enzima, se efectuó en la porción cortical, ipsilateral a la administración, correspondiente a la neocorteza gustativa (áreas 13 y 14 de Krieg), en la cual se observó un marcaje consistente en el interior de los pericariones de las neuronas piramidales que caracterizan tanto a la porción insular como a la somatosensorial de esta región cerebral.

El patrón de distribución de la peroxidasa en el interior de los somas neuronales fue homogéneo y denso, sin penetrar al núcleo celular.

El marcaje adecuado, observado en los grupos control, confirma la elección apropiada del tiempo de sobrevida post-administración, involucrado en nuestros experimentos (26 horas), el cual fue determinado por ensayo-error, considerando el lapso existente entre la inoculación y el inicio de la

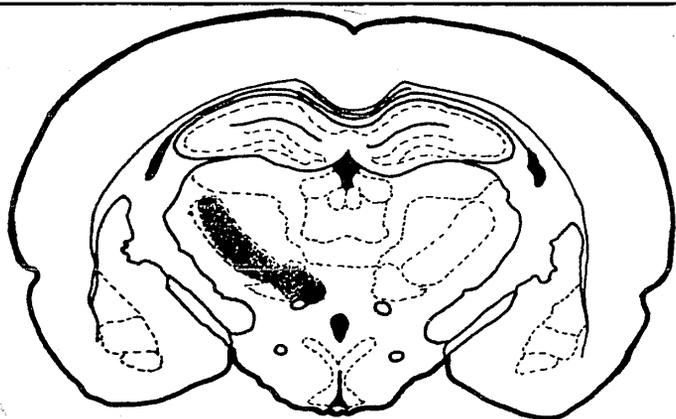
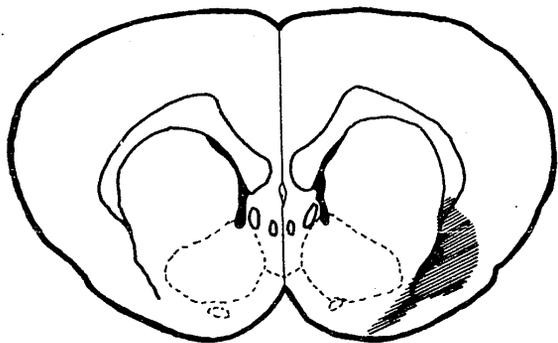


Figura 4. HRP en los núcleos ventromedial (VM) y ventroposteromedial (VPM) talámicos (A). La peroxidasa fue inoculada en neocorteza gustativa de los sujetos control (B 32X, C 80X y D 800X)

endocitosis, el tiempo de acumulación de la enzima en el sitio de detección, la tasa de transporte retrógrado de IRP, así como la longitud de la vía estudiada.

Con base en lo anterior y mediante el empleo de la técnica citada, se ha evidenciado la presencia de conexiones neurales entre los tejidos homotópicos transplantados y sus huéspedes. Así, en sujetos transplantados unilateralmente en corteza (neocorteza gustativa, áreas 13 y 14), los cuales recibieron administración de peroxidasa en la amígdala ipsilateral al trasplante fue detectada la existencia de neuronas marcadas principalmente hacia la porción media interior de los mismos; fig. 10.

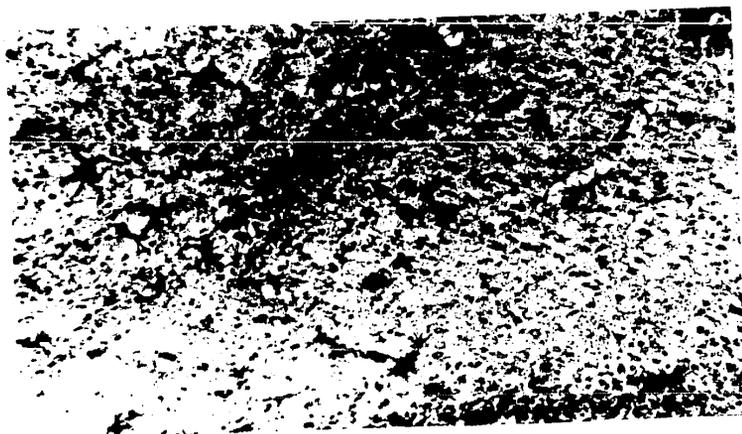
Sin embargo, la densidad de neuronas marcadas por la enzima, fue considerablemente menor en comparación a la registrada en los grupos control, tal como ha sido descrito en la generalidad de los trabajos que involucran el estudio de las proyecciones trasplante-huésped (Bjorklund et al., 1982; Jaeger y Lund, 1981; Bjorklund y Stenevi, 1984; Kristensson y Sjostrand, 1972; La Vail y La Vail, 1972). La disminución, en cuanto a la densidad poblacional de neuronas marcadas, en el interior de los implantes, obedece a una serie de factores entre los que destacan, el número de neuronas maduras dentro del trasplante y en consecuencia, la densidad de la arborización terminal presente en la zona de administración (Jones, 1975). Influyen asimismo, la tasa de transporte axonal, la longitud del sistema de fibras estudiado, así como la tasa de degradación lisosomal (Mauta et al., 1975).



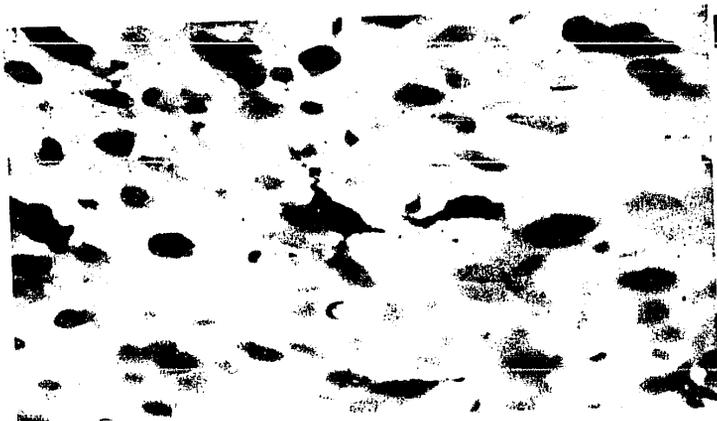
A



B



C



D

Figura 10. HRP en transplantes neocorticales (A). la peroxidasa fue detectada en la región centro-medial de los transplantes (indicado por flechas). la HRP fue administrada en el complejo amigdalino (B 32X, C 80X y D 800X)

El patrón de distribución de la peroxidasa en el interior de las neuronas del transplante, fue similar al observado en los sujetos control, es decir, presentan una distribución homogénea en el pericarión piramidal, sin penetrar en el núcleo celular.

Por su parte, en sujetos con trasplantes amigdalinos, a los cuales se les administró peroxidasa en la región cortical correspondiente a neocorteza gustativa (ipsilateral al transplante), fue detectada la existencia de neuronas marcadas en las áreas correspondientes a la ubicación del complejo amigdalino (fig. 11).

Cabe destacar, el hecho de que, pese a que la generalidad de los trasplantes amigdalinos analizados, abarcan una zona amplia en el sentido ventro-dorsal del cerebro, las neuronas marcadas con peroxidasa se ubican fundamentalmente hacia la porción basal de los mismos, es decir, hacia la zona correspondiente al complejo amigdalino.

La densidad de neuronas marcadas con HRP en el interior de los implantes, fue menor en comparación con la registrada en los sujetos control, de manera similar a lo observado en los trasplantes corticales. El patrón de distribución de la peroxidasa dentro de las neuronas del implante, mostró características similares a las observadas en los grupos control.

En el caso de sujetos con transplante amigdalino fueron detectadas neuronas marcadas en las regiones talámicas correspondientes a los núcleos ventromedial y ventroposteromedial, ipsilateral a la administración de HRP fig. 12.

La menor densidad poblacional de neuronas marcadas por HRP,

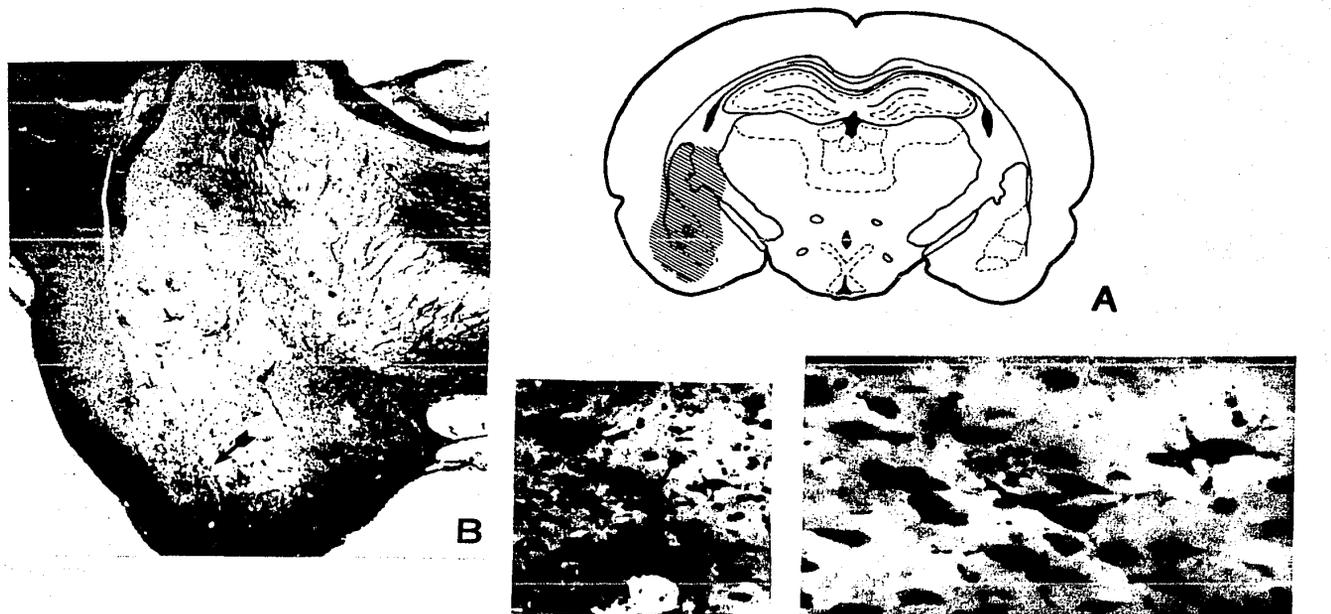
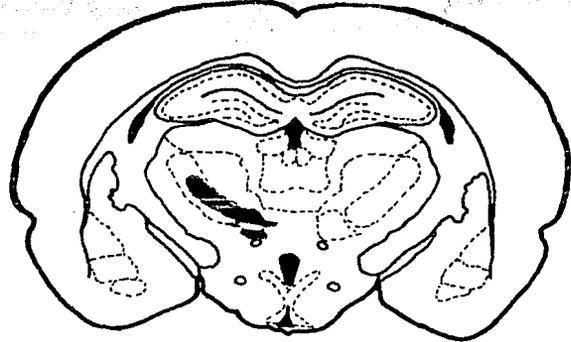


Figura 11. HRP en trasplantes amigdalínicos (A). El área circunscrita (flecha), señala la porción del complejo amigdalino al interior del trasplante, marcado con HRP. La peroxidasa fue administrada en neocorteza gustativa (B 32X, C 320X y D 800X).

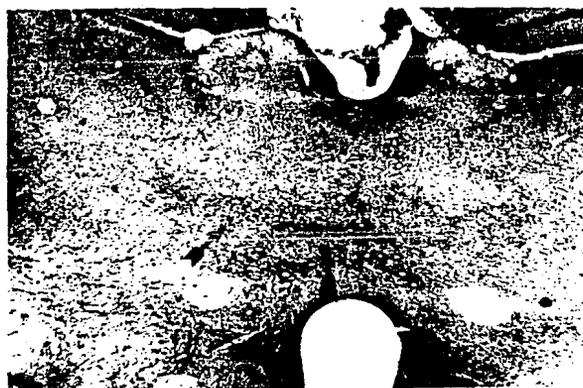
registrada en el interior de los trasplantes corticales y amigdalinos, confirma los resultados obtenidos por La Vail y La Vail (1972) y Kristenson y Sjostrand (1972), en los que se destaca la participación decisiva del grado de desarrollo de las neuronas del implante en los procesos de reinervación. Sin embargo, la consistencia en el marcaje en todos los sujetos analizados, respalda las premisas de Wallberg et al., (1976) y Kristensson y Sjostrand en 1972, en los que se demuestra que las células en fase de crecimiento, ya sea en un animal juvenil o en un experimento de reinervación por regeneración, incorporan peroxidasa con mayor eficiencia. La Vail y La Vail (1972) mostraron resultados similares en fenómenos de rebrote axonal. En este sentido, es necesario diferenciar la alta eficiencia de incorporación de peroxidasa por parte de una neurona en fase de crecimiento, de la disponibilidad de proyecciones axonales (arborización terminal) que hayan alcanzado el sitio de administración, ya sea, la neocorteza gustativa, en el caso de los trasplantes amigdalinos, o el complejo amigdalino, en el caso de los trasplantes corticales.

Aunada a estas consideraciones, es importante señalar una de las premisas derivadas de los trabajos de Gibb y Cotman (1986), en el sentido de que las fibras formadas en los trasplantes, compiten selectivamente con las proyecciones nativas del huésped durante el proceso de reinervación.

Por otra parte, es importante destacar, el alto grado de integración de los trasplantes homotópicos corticales y amigdalinos en relación al tejido huésped, observado en todos los



A



B



C



D

Figura 17. Neuronas marcadas retrógradamente en VH y VPM de sujetos transplantados (A). La HRP fue administrada en neocorteza gustativa (B 32X, C 200X, y D 300X).

sujetos estudiados. En este sentido, fue posible apreciar, la formación de un verdadero neuropilo implante-huésped, así como la participación de una profusa vascularización en todos los implantes homotópicos analizados, en concordancia con lo observado por Brasko y Das (1986), en sus trabajos sobre desarrollo, diferenciación e integración de los transplantes.

Finalmente, en relación a la caracterización estructural de los transplantes heterotópicos practicados en neocorteza gustativa (tectum-NG), es necesario señalar que éstos, exhiben una invasión profusa de tejido glial, amplias zonas de necrosis, deficiente integración con el tejido huésped, avascularización y ausencia de neuronas marcadas con HRP (fig. 13).

Al conjuntar, la integración anatómica deficiente de los implantes heterotópicos, con la ausencia de recuperación funcional de los sujetos, es posible apreciar la participación de tal integración estructural, en los procesos funcionales y por ende cognoscitivos. Sin embargo, la ausencia de neuronas diferenciadas en los transplantes heterotópicos, nos impide elaborar conclusiones acerca de la especificidad de la reinervación, de las neuronas de origen de los implantes.



Figura 13. Aspecto de un transplante heterotópico cortical, el tejido procede de tallo cerebral fetal, colocado en el área correspondiente a neocorteza gustativa, (32X).

CAPITULO VI

Discusión General

El trasplante de tejido cerebral fetal, es hoy en día una de las herramientas más versátiles y promisorias con las que cuenta la Neurobiología. El tejido nervioso fetal implantado en el SNC de huéspedes adultos, ha permitido estudiar fenómenos como el desarrollo de conexiones recíprocas; la reconstrucción de circuitos neurales lesionados; la estimulación de la regeneración axonal tras la disección y subsecuente degeneración walleriana de fibras neuronales; las variaciones en los niveles de neurotransmisores y/o neuromoduladores; la generación de factores tróficos; la recapitulación de la ontogenia neural y, por supuesto, la recuperación conductual.

En el presente estudio, ha sido evidenciada, mediante el empleo de peroxidasa de rábano, la presencia de conexiones neurales entre los trasplantes homotópicos de neocorteza gustativa y complejo amigdalino y, el tejido huésped, fundamentalmente entre las áreas 13 y 14 de Krieg de la neocorteza gustativa, los núcleos ventromedial y ventroposteromedial talámicos, y los núcleos lateral y basolateral del complejo amigdalino; la presencia de tales conexiones ha sido reportada en condiciones normales, es decir, en sujetos no transplantados, por Lasiter et al., (1982) y por Lasiter y Glanzman, 1983).

Lo anterior revela la existencia de procesos dinámicos de interacción trasplante - huésped, en los que la reinervación y la vascularización, desempeñan sin lugar a dudas, un papel

preponderante. Esto, se ve respaldado por los resultados que recientemente han sido aportados por las técnicas de Nissl, Golgi rápido y doble impregnación argéntica, mediante las cuales han sido analizados algunos transplantes homotópicos neocorticales efectuados en nuestro laboratorio. Dichos estudios, demuestran la existencia de neuronas en franco proceso de diferenciación, dentro de los transplantes, lo cual, constituye una de las premisas derivadas a partir de los estudios morfológicos en transplantes, realizados por Kromer et al. (1980), asimismo, estas investigaciones muestran la presencia de paquetes de fibras nerviosas y vasos sanguíneos que cruzan la barrera glial que circunda los transplantes, permitiendo la comunicación entre el tejido huésped y el implante, lo cual concuerda con los estudios de Kruger et al. (1986).

Por su parte, la citoarquitectura de los transplantes heterotópicos corticales analizados, caracterizada por una pobre integración tanto nerviosa como circulatoria, la presencia de zonas extensas de necrosis, y la profusa invasión glial, nos habla de la relevancia que la integración neuroanatómica posee dentro de los procesos de reintegración funcional. No obstante, la carencia de neuronas marcadas con peroxidasa y por ende de proyecciones que permitan la interconexión de estos transplantes, obstaculiza la determinación de la especificidad que las conexiones neurales presentan hacia los diferentes tejidos implantados.

Ahora bien, el grado de reinervación evidenciado a través de nuestras investigaciones, apoya los conceptos derivados de

los trabajos de Gibbs y Cotman (1986) así como los de Ross y Ebner (1985); Deckel et al. (1985); Lund y Hauschka (1976), en el sentido de que la reinervación o interconexión, trasplante-huésped, definitivamente no alcanza la densidad volumétrica, la extensión espacial, ni la naturaleza neuroquímica que caracterizan, en condiciones normales, a los cerebros huésped. Esto puede verse claramente al comparar la densidad de neuronas marcadas con HRP en los núcleos lateral y basolateral amigdalinos de los sujetos control, que recibieron administración de la enzima en neocorteza gustativa (fig. 8), en relación con los sujetos portadores de trasplantes en el complejo amigdalino (fig. 11) en los que la inoculación de peroxidasa se efectuó también en neocorteza, el mismo fenómeno se registra al observar los sujetos controles y transplantados en neocorteza (figs. 10).

Sin embargo, y pese a las diferencias en la densidad neuronal, la presencia de proyecciones que interconectan al implante con su huésped, queda sin lugar a dudas manifiesta, reafirmando la potencialidad de los trasplantes para establecer conexiones neurales extensas con el cerebro huésped (Bjorklund et al. 1976, 1979, 1980; Bjorklund y Stenevi 1977, 1979; Beebe et al., 1979; Jaeger y Lund 1979, 1980; McLoon y Lund 1980; McLoon et al., 1982; Kromer y Bjorklund 1980; Lewis y Cotman 1980, 1983; Oblinger y Das 1982; Oblinger et al., 1980). A este respecto es necesario subrayar la alta especificidad en cuanto a la estructura reinervada, de manera que a través de la voluminosa literatura que sobre reconexión de trasplantes se ha generado hasta la fecha, se pone de manifiesto la inequívoca precisión con

la que los trasplantes envían y reciben proyecciones neuronales.

Todo esto, nos lleva a reflexionar acerca del papel que la reinervación desempeña en la recuperación conductual de los sujetos trasplantados; se trata de deslindar por ende la función de los trasplantes, ya sea como estructuras blanco (Lund y Hauschka 1976; Ohlinger et al., 1980; Sunde y Zimmer 1983), o bien como meros promotores de sustancias tróficas (Bjorklund et al., 1983), en cuyo caso, fungirían como potenciadores del sprouting o rebrote axonal, que constituye una de las manifestaciones de la plasticidad neuronal (Lynch et al., 1972). No obstante, estas dos posturas no son, en sentido estricto, mutuamente excluyentes, como lo atestiguan los trabajos de Sharp y González (1985) o los de Bjorklund et al. (1983), en los que los trasplantes fungen como estructuras blanco en el proceso de reinervación, al tiempo que promueven y generan la liberación de factores de crecimiento neuronal.

Las experiencias originadas a partir de las investigaciones efectuadas en nuestro laboratorio, sugieren, que si bien la integración del tejido trasplantado con el cerebro huésped, a través de la vascularización y la reinervación, desempeña un papel decisivo en la recuperación conductual, particularmente de los sujetos con trasplantes corticales, sería aventurado el adjudicar a la reinervación de los trasplantes, la totalidad de la reactivación funcional de los sujetos, en virtud de las características neuroestructurales y de la capacidad neuroquímica inherentes a los trasplantes de tejido cerebral fetal, es decir, que ni la neuroestructura, ni la capacidad neuroquímica de

Los transplantes, alcanzan la complejidad original que caracteriza a una determinada región dentro de un cerebro normal.

Así pues, el presente estudio constituyó una primera aproximación, a la integración neuroanatómica de los transplantes neocorticales y amigdalinos dentro de un cerebro huésped. Nos fue posible presenciar la capacidad de los transplantes, para reinervar algunas regiones del cerebro huésped; constatamos asimismo, que tales regiones, correspondían a parte de las estructuras inervadas normalmente por la neocorteza gustativa y el complejo amigdalino, evidenciando la notable participación de las vías amigdalocorticales, así como de las tálamo-corticales, en los procesos de reinervación de nuestros transplantes.

En cuanto a la densidad poblacional de las neuronas involucradas en los procesos de interconexión, fué posible apreciar una notable disminución en comparación con el tejido control, como se expresó en la discusión parcial de los resultados. Esto nos habla, de la impresionante capacidad de restauración funcional del SNC, aún en presencia de un escaso número de neuronas interconectadas con algunas estructuras del tejido huésped; lo cual, sugiere la posibilidad de que alguna otra estructura cerebral, se encuentre involucrada en la restauración funcional; ya sea a través de rebrote axonal y/o a través de neurosecreciones.

Tanto los transplantes corticales, como los amigdalinos, presentaron una clara disminución en cuanto a la densidad de inervación, en contraste con los sujetos control. Sin embargo, no se observaron diferencias aparentes entre ambos tipos

de trasplantes homotópicos, por lo que no es posible adjudicar a la reinervación diferencial de los trasplantes, cuando menos con las estructuras analizadas en el presente trabajo, las diferencias en cuanto a la recuperación funcional de la neocorteza gustativa y del complejo amigdalino.

Por su parte, la permanente difusión de la peroxidasa de rábano, en los casos en los que fue administrada en el interior de los trasplantes, imposibilitó el análisis de las aferencias procedentes del tejido huésped, que posiblemente arribaron a los implantes.

Asimismo, fue notoria la importancia de la integración citoarquitectónica, en relación con el grado de reinervación, en los trasplantes neocorticales.

De esta manera, nuestros estudios constituyen los primeros pasos, encaminados a deslindar el papel que los trasplantes neocorticales y amigdalinos, desempeñan en el interior de los cerebros de los sujetos huésped, y nos llevan a plantearnos nuevas interrogantes, acerca de la dinámica anatómica y funcional, de las estructuras involucradas en el CAS, sin perder de vista, el hecho de que el establecimiento de conexiones neuronales y, por ende, de comunicación intracerebral, se encuentra estrechamente relacionado con la amplia gama de funciones en las que intervienen, tanto la NG como el complejo amigdalino. Es decir, la pregunta global, se encuentra encaminada hacia la comprensión de ese todo complejo e insondable, de ese cosmos, que es el SNC de los seres vivos.

BIBLIOGRAFIA

- Aggleton, J.P., Petrides, M. y Iversen, S.D. (1981). Differential effects of amygdaloid lesions on conditioned taste aversions learning in rats. *Physiol. Behav.* 27:397-400
- Altobelli, J. (1914). Innessi cerebrali. *Gazz. int. med. Chir.* 17: 25-34
- Anderson, K.J., Gibbs, R.B., Salvaterra, P.M. y Cotman, C.W. (1985). Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in septal neurons transplanted to the rat hippocampus. *Soc. Neurosci. Abstr.*, Vol. 11, Part 1, p.XXX
- Arendash, G.W. y Gorski, R.A. (1982). Enhancement of sexual behaviour in female rats by neonatal transplantation of brain tissue from males. *Science* 217:1276-78
- Arvidson, J. (1975). Location of cat trigeminal ganglion cells innervating dental pulp of upper and lower canines studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 99: 135-139
- Beebe, B.K., Møllgard, K., Bjorklund, A. y Stenevi, H. (1979). Ultrastructural evidence of synaptogenesis in the adult rat dentate gyrus from brain stem implants. *Brain Res.* 167:391-95
- Benjamin, R.M. y Akert, K. (1959). Cortical and thalamic areas involved in taste discrimination in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 111: 231-259
- Benjamin, R.M. y Pfaffmann, C. (1955). Cortical localization of taste in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 18: 56-64
- Bermúdez-Rattoni, F. (1986). La integración neural de los hábitos alimenticios. *Bol. Estud. Méd. Biol., Méx.*, 34:43-50
- Bermúdez-Rattoni, F., Chávez, A.F., Coburn, K. y García, J. (1983). The role of the amygdala cholinergic activity in taste potentiated odor aversion learning. *Soc. Neurosci. Abstr.* 9:827
- Bermúdez-Rattoni, F., Fernández, J., Sánchez, M.A., Aguilar-Roblero, R. y Drucker-Colín, R. (1987). Fetal brain transplants induce recuperation of taste aversion learning. *Brain Res.* 416:147-152
- Bermúdez-Rattoni, F., Grijalva, C.V., Kiefer, W.K. y García, J. (1986). Flavor-Illness Aversions: The role of the amygdala in the acquisition of taste-potentiated odor aversions. *Physiol. Behav.* 38(4): 1-6

- Bermúdez-Rattoni, F., Rusiniak, K.W. y García, J. (1983). Flavor illness aversions; potentiation of odor by taste is disrupted by applications of novocaine into amygdala. *Behav. Neur. Biol.*, 37:61-75

- Berry, M. (1979). Regeneration in the central nervous system. In W. Thomas Smith y J.B. Cavanagh (eds): *Recent Advances in Neuropathology*, Vol. 1. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp.65-111

- Berry, M. (1983). Regeneration of axons in the central nervous system. *Prog. Anat.* 3:213-233

- Berry, M. (1985). Regeneration and plasticity in the CNS. In M. Swash y C. Kennard (eds): *Scientific Basis of Clinical Neurology*. Edinburgh:Churchill Livingstone

- Berry, M., Maxwell, W.L., Logan, A., Mathewson A., McConnell, P., Ashurst, D.E. y Thomas, G.H. (1983). Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neuroch.* 32:31-53

- Bjorklund, A., Dunnett, S.B., Stenevi, U., Lewis, M.E. y Iversen, S.D. (1980). Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res.* 199:307-33

- Bjorklund, A., Kromer, L.F. y Stenevi, U. (1979). Cholinergic reinnervation of the rat hippocampus by septal implants is stimulated by perforant path lesions. *Brain Res.* 173:57-64

- Bjorklund, A. y Stenevi, U. (1977). Experimental reinnervation of the rat hippocampus by grafted sympathetic ganglia I. Axonal regeneration along the hippocampal fimbria. *Brain Res.* 138:259-70

- Bjorklund, A. y Stenevi, U. (1979). Reconstruction of brain circuitries by neural transplants. *Trends Neurosci.* 2:301-6

- Bjorklund, A. y Stenevi, U. (1984). Intracerebral Neural Implants: Neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries. *Ann. Rev. Neurosci.* 7:279-308

- Bjorklund, A., Stenevi, U. y Dunnett, S.B. (1983). Transplantation of brain stem monoaminergic "command systems": A model for functional reactivation of damaged CNS circuitries. In *Spinal Cord Reconstruction*, ed. C. C. Kao, R.P. Bunge, P.J. Reier, pp.397-413. N.Y. Raven

- Bjorklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S.B. y Gage, F.H. (1982). Cross-species neural grafting in a rat model of Parkinson's disease. *Nature* 298:625-54
- Bjorklund, A., Stenevi, U., Schmidt, R.H., Dunnett, S.B. y Gage, F.H. (1983). Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II. Survival and growth of nigral cells implanted in different brain sites. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 522:11-22
- Bjorklund, A., Stenevi, U. y Svendgaard, N.A. (1976). Growth of transplanted monoaminergic neurones into the adult hippocampus along the perforant path. *Nature.* 262:787-90
- Black, I.B. (1985). Actions of Nerve Growth Factor (NGF) in CNS. *Soc. Neurosci. Abstr.*, Vol. 11, Part 1, p. XXX
- Brasko, J. y Das, G.D. (1986). Neural transplants: Interface and Connectivity. *Soc. Neurosci. Abstr.*, Vol. 12, Part 2, p. XXX
- Braun, J.J., Lasiter, P.S. y Kiefer, S.W. (1982). The gustatory neocortex of the rat. *Physiol. Psychol.* 10:13-45
- Braun, J.J., Slick, F.B. y Lorden, J.F. (1972). Involvement of gustatory neocortex in the learning of taste aversions. *Physiol. Behav.* 9:637-641
- Colman, D.R., Scalfia, F. y Cabrales, E. (1976). Light and electron microscopic observations on the anterograde transport of horseradish peroxidase in the optic pathway in the mouse and rat. *Brain Res.* 102:156-163
- Cornbrooks, C.J. y Kromer, L.F. (1986). Transplants of Schwann cell-derived extracellular matrix fail to promote regeneration of CNS cholinergic neurons in vivo. *Soc. Neurosci. Abstr.*, Vol. 12, Part 1, p. XXX
- Cowan, W.M., Raisman, G. y Powell, T.P.S. (1965). The connections of the amygdala. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 28:137-151
- Crosby, S.J. y Humphrey, T. (1941). Studies on the vertebrate telencephalon. II. The nuclear pattern of the anterior olfactory nucleus, tuberculum olfactorium and the amygdaloid complex in adult man. *J. Comp. Neurol.*, 74:309-352
- Danscher, G. y Zimmer, J. (1978). An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry.* 55:27-40
- Das, G.D., Das, K.G., Brasko, J. y Alemán-Gómez, J. (1983). Neural transplants: Volumetric analysis of their growth and histopathological changes. *Neurosci. Lett.* 41: 73-79

- Deckel, A.W., Moran, T.H. y Robinson, R.G. (1985). Reversal of spontaneous locomotor hyperactivity following fetal transplants of the striatum occurs independent of DA mechanisms. Soc. Neurosci. Abstr., Vol. 11, Part 1, p.XXX
- Detwiler, S.R. (1936). Neuroembryology: An Experimental Study. New York:Macmillan
- Dunnett, S.B., Iow, W.C., Iversen, S.D., Stenevi, U. y Bjorklund, A. (1982). Septal transplants restore maze learning in rats with fornix-fimbria lesions. Brain. Res. 251:335-348
- Ebner, F.F. y Erzurumlu, R.S. (1985). Innervation of embryonic neocortical cell suspensions by thalamocortical axons of different aged hosts. Soc. Neurosci. Vol. 11, Part 1, p. XXX
- Fox, C.A. (1940). Certain basal telencephalic centers in the cat. J. Comp. Neurol., 72:1-62
- Fox, C.A. (1943). The stria terminalis, longitudinal association bundle and precommissural fornix fibers in the cat. J. Comp. Neurol., 79:277-291
- Fredman, S.M. y Gage, P.G. (1986). A conditioning lesions promotes axonal regeneration and synapse formation in a giant neuron in Aplysia. Soc. Neurosci. Vol. 12, Part 1, p. XXX
- Garcia, J., Kimeldorf, D.J. y Koelling, R.A. (1955). A conditioned aversion towards saccharin resulting from exposure to gamma radiation. Science. 122:157-159
- Garcia, J., Ervin., F.R., Yorke, C.H. y Koelling, R.A. (1967). Conditioning with delayed vitamin injections. Science 155: 716
- Garcia, J., Lasiter, P.S., Bermúdez-Rattoni, F. y Deems, D. (1985). A general theory of aversion learning. Ann. N.Y. Ac. Sc. 443:8-20
- Gibbs, R.B. y Cotman, C.W. (1986). Factors affecting survival and outgrowth from transplants of entorhinal cortex. Soc. Neurosci. Abstr., Vol. 12 Part 2, p.XXX
- Gloor, P. (1955). Electrophysiological studies on the connections of the amygdaloid nucleus in the cat. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol., 7:243-264
- Gloor, P. (1960). Amygdala. In: Handbook of Physiology, Sect. 1, Vol.2, edited by J. Field, H.W. Magound, and V.E. Hall, pp.1395-1420. American Physiological Society, Washington.
- Gold, R.M. y Proulx, D.M. (1972). Bait-shyness acquisition is impaired by VMH lesions that produce obesity. J. Comp. Physiol. Psychol. 79:201-209

- Hallas, B.H., Das, G.D. y Das, K.G. (1980). Transplantation of brain tissue in the brain of rat. II. Growth characteristics of neocortical transplants in hosts of different ages. *Am. J. Anat.* 158:147-59
- Hansson, H.A. (1973). Uptake and intracellular bidirectional transport of horseradish peroxidase in retinal ganglion cells. *Exp. Eye Res.* 16:377-388
- Harvey, A.R. y Lund, R.D. (1981). Transplantation of fetal tissue in rats. II. Distribution of host neurons which project to transplants. *J. Comp. Neurol.* 202:502-20
- Hedreen, J.C. y McGrath, S. (1977). Observations on labeling of neuronal cell bodies, axons and terminals after injection of horseradish peroxidase into rat brain. *J. Comp. Neurol.* 176:225-46
- Heimner, I. y Rohards, M.J. (1982). *Neuroanatomical Trac-tracing Methods*. Plenum Press. New York and London
- Heuser, J.E. y Reese, T.S. (1975). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57:315-344
- Hollander, V.R., Saunders, B.C., Rose, F.L. y Walpole, A.L. (1974). A safer substitute for benzidine in the detection of blood. *Tetrahedron.* 30:3299-3302
- Holtzman, E. (1977). The origin and fate of secretory packages, especially synaptic vesicles. *Neuroscience* 2:327-355
- Isacson, D., Dunnett, S.B. y Bjorklund, A. (1985). Functional and anatomical effects of striatal neural grafts to the excitotoxically lesioned striatum. *Soc. Neurosci. Abstr.*, Vol 11, Part 1, p.XXX
- Jaeger, C.B. y Lund, R.D. (1979). Efferent fibers from transplanted cerebral cortex of rats. *Brain Res.* 165:338-42
- Jaeger, C.B. y Lund, R.D. (1980). Transplantation of embryonic occipital cortex to the tectal region of newborn rats: A light microscopic study of organization and connectivity of the transplants. *J. Comp. Neurol.* 194:571-97
- Jaeger, C.B. y Lund, R.D. (1981). Transplantation of embryonic occipital cortex to the brain of newborn rats: A Golgi study of mature and developing transplants. *J. Comp. Neurol.* 200:213-30
- Jones, E.G. (1975). Possible determinants of the degree of retrograde neuronal labeling with horseradish peroxidase. *Brain Res.*, 85:249-253

- Jones, E.G., Coulter, J.D., Burton, H. y Porter, R. (1977). Cells of origin and terminal distribution of corticostriatal fibers arising in the sensory-motor cortex of monkeys. *J. Comp. Neurol.* 173:53-80
- Kater, S.B. y Nicholson, C. (1973). *Intracellular staining in neurobiology.* Springer-Verlag, Berlin and New York
- Keefer, D.A. (1978). Horseradish peroxidase as a Retrogradely transported detailed dendritic marker. *Brain Res.* 140: 15-32
- Keilin, D. y Hartree, E.F. (1951). Purification of horseradish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and metahemoglobin. *Biochem. J.* 49:88-104
- Kevetter, G.A. y Winans, S.S. (1981). Connections of the corticomедial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the "vomeronasal amygdala". *J. Comp. Neurol.* 197: 99-111
- Kiefer, S.W. (1985). Neural mediation of conditioned food aversions an experimental assesments and clinical applications of conditioned food aversions. Braveman, N.S. y P. Bronstein. (Eds.) *Ann. N.Y. Ac. Sc.* 443:100-109
- Kiernan, J.A. (1979). Hypotheses concerned with axonal regeneration in the mammalian nervous system. *Biol. Rev.* 54:155-197
- Kim, C.C. y Strick, P.L. (1976). Critical factors involved in the demonstration of horseradish peroxidase retrograde transport. *Brain Res.* 103: 356-361
- Krettek, J.E. y Price, J.L. (1974). A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex. *Brain Res.* 67:169-174
- Krettek, J.E. y Price, J.L. (1977). The cortical projection of the medio dorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 171:157-192
- Krettek, J.E. y Price, J.L. (1978). Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J. Comp. Neurol.* 178: 225-254
- Kristensson, K. y Olson, Y. (1971). Retrograde axonal transport of protein. *Brain Res.* 29:363-365
- Kristensson, K. y Sjostrand, J. (1972). Retrograde transport of protein tracer in the rabbit hypoglossal nerve during regeneration. *Brain Res.* 45:175-181

- Kromer, L.F. y Bjorklund, A. (1980). Embryonic neural transplants provide model systems for studying development and regeneration in the mammalian CNS. In Multidisciplinary Approach to Brain Development. ed. C. di Bernadetta pp. 409-26 Amsterdam
- Kromer, L.F., Bjorklund, A. y Stenevi, U. (1980). Innervation of embryonic hippocampal implants by regenerating axons of cholinergic septal neurons in the adult rat. Brain Res. 210:153-71
- Kromer, L.F., Bjorklund, A. y Stenevi, U. (1981). Regeneration of septohippocampal pathway in adult rats is promoted by utilizing embryonic hippocampal implants as bridges. Brain Res. 210:173-200
- Kruger, S., Sievers, J., Hansen Ch., Sadler, M. y Berry, M. (1986). Three morphologically distinct types of interface develop between adult host and fetal brain transplants: implications for scar formation in the adult central nervous system. J. Comp. Neurol. 249:103-116
- Labbe, R., Firl, A., Mufson, E. y Stein, D. (1983). Fetal brain transplants reduction of cognitive deficit in rats with frontal cortex lesions. Science. 221:470-472
- Lammer, H.J. (1972). The neural connections of amygdaloid complex in mammals. In: The neurobiology of the amygdala, edited by B.E. Eleftheriou. pp.123-144. Plenum Press, New York
- Lasiter, P.S. (1982). Cortical substrates of taste aversion learning: Direct amygdalocortical projections to the gustatory neocortex do not mediate conditioned taste aversion learning. Physiol. Psychol. Vol. 10(4) 377-383
- Lasiter, P.S., Deems, D.A. y Glanzman, D.I. (1985). Thalamic relations in taste aversion learning. Behav. Neurosci. 99:454-476
- Lasiter, P.S. y Glanzman, D.I. (1983). Cortical substrates of taste aversion learning: involvement of the dorsolateral amygdaloid nuclei and temporal neocortex in taste aversion learning. Behav. Neurosci. 99:257-276
- Lasiter, P.S., Glanzman, D.I. y Mensah, P.A. (1982). Direct connectivity between pontine taste areas and gustatory neocortex in rat. Brain Res. 234:11-121
- La Vail, J.H. (1975). The retrograde transport method. Fed. Proc. 34:1618-1624
- La Vail, J.H. y La Vail, M.M. (1972). Retrograde axonal transport in the central nervous system. Science. 176:1416-1417

- Le Gross Clark, W.E. (1940). Neuronal differentiation in implanted fetal cortical tissue. *J. Neurol. Psychiatr.*, 3:263-272
- Levi-Montalcini, R. (1952). Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 55:330-343
- Lewis, E.R. y Cotman, C.W. (1980). Mechanisms of septal lamination in the developing hippocampus revealed by outgrowth of fibers from septal implants. I. Positional and temporal factors. *Brain Res.* 196:307-30
- Lewis, E.R. y Cotman, C.W. (1983). Neurotransmitter characteristics of brain grafts: Striatal and septal tissues form the same laminated input to the hippocampus. *Neuroscience* 8:57-66
- Liesi, P. (1983). Laminin in cultured mouse C 1300 neuroblastoma cells: immunocytochemical localization by pre and postembedding electron microscopic procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 31:755-764
- Liesi, P., Dahl, D. y Vaheri, A. (1983). Laminin is produced by early rat astrocytes in primary cultures. *J. Cell. Biol.* 96:920-924
- Liesi, P., Kaakkola, S. Dahl, D. y Vaheri, A. (1984). Laminin is induced in astrocytes of adult brain by injury. *EMBO. J.* 3:683-686
- Lindsay, R.M. (1984). An autoradiographic study of neuronal development, vascularization and glial cell migration from hippocampal transplants labelled in intermediate explant culture. *Neuroscience* 12:513-530
- Low, W.C., Lewis, P.R., Bunch, S.T., Dunnett, S.B., Thomas, S.R., Iversen, S.D., Bjorklund, A. y Stenevi, U. (1982). Functional recovery following transplantation of embryonic septal nuclei into adult rats with septo-hippocampal lesions: the recovery of function. *Nature (London)*, 300:260-262
- Lund, R.D. y Harvey, A.R. (1981). transplantation of tectal tissue in rats. I. Organization of transplants and pattern of distribution of host afferents within them. *J. Comp. Neurol.* 201:191-206
- Lund, R.D. y Hauschka, S.D. (1976). Transplanted neural tissue develops connections with host rat brain. *Science.* 193:582-84
- Lynch, G., Matthews, D.A., Mosko, S., Parks, T. y Cotman, C. (1972). Induced acetylcholinesterase rich layer in rat dentate gyrus following entorhinal lesions. *Brain. Res.* 42:311-318

- Madrazo, I., Drucker-Colin, R., Díaz, V., Martínez-Mata, J., Torres, C. y Becerril, J.J. (1987). Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N. Eng. J. Med.* 316:831-834
- Matthey, R. (1926). La greffe de l'oeil. Etude expérimentale de la greffe de l'oeil chez le Triton (Triton cristatur). *Arch. Entw. Org.* 109:326-41
- Mc Connell, S.K. (1985). Migration and differentiation of cerebral cortical neurons after transplantation into the brains of ferrets. *Science.* 229:1268-1271
- Mc Gowan, B.K., García, J., Ervin, F.R. y Schwartz, J. (1969). Effects of septal lesions on bait-shyness in the rat. *Physiol. Behav.* 4:907-909
- McLoon, S.C. y Lund, R.D. (1980). Identification of cells in retinal transplants which project to host visual centers: A horseradish peroxidase study in rats. *Brain Res.* 197:431-95
- McLoon, L.K., Lund, R.D., Mc Loon, S.C. (1982). Transplantation of reaggregates of embryonic neural retinae to neonatal rat brain: Differentiation and formation of connections. *J. Comp. Neurol.* 205:179-89
- McLoon, L.K., Mc Loon, S.C. y Lund, R.D. (1981). Cultured embryonic retinae transplanted to rat brain: Differentiation and formation of projections to host superior colliculus. *Brain Res.* 226:15-31
- Mesulam, M.M. (1979). Tracing neural connections of human brain with selective silver impregnation. *Arch. Neurol.* 36:814-818
- Mesulam, M.M. (1982). Tracing neural connections with horseradish peroxidase. John Wiley and Sons. New York
- Mesulam, M.M. y Mufson, E.J. (1980). The rapid anterograde transport of horseradish peroxidase. *Neurosci.* 5:1277-1259
- Miller, C.R., Elkins, R.L. y Peacock, L.J. (1971). Disruption of a radiation-induced preference shift by hippocampal lesions. *Physiol. Behav.* 1:145-146
- Mugnani, E. (1965). "Dark cells" in electron micrographs from the central nervous system of vertebrates. *J. Ultrastr. Res.* 12: 235- 236
- Muller, H. W., Beckh, S. y Seifert, W. (1984). Neurotrophic factor for central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:1248-1252

- Nachman, M. y Ashe, J.H. (1974). Effects of basolateral amygdala lesions on neophobia, learned taste aversions, and sodium appetite in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 87:622-643
- Nauta, H.J.W., Kaiserman-Abramof, I.R. y Lasek, R.L. (1975). Electron microscopic observations of horseradish peroxidase transported from the caudoputamen to the substantia nigra in the rat: posible involvement of the agranular reticulum. *Brain Res.* 85:373-384
- Neuberger, T.J., Kromer, L.F. y Cornbrooks, C.J. (1986). Time of axonal regeneration associated with transplants of cultured Schwann cells and extracellular matrix. *Soc. Neurosci. Abstr.*, Vol.12 Part 1, p.XXX
- Nieto-Sampedro, M., Lewis, E.R., Cotman, C.W., Manthorpe, M. Skaper, S.D. Barbin, G., Longo, F.M. y Varon, S. (1982). Brain injury cause a time-dependent increase in neurotrophic activity at the lesion site. *Science.* 217:860-61
- Norgren, R. (1976). Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J. Comp. Neurol.* 166:17-30
- Norgren, R. y Grill, H.J. (1976). The taste reactivity test .I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res.* 143:263-279
- Norgren, R. y Wolf, G. (1975). Projections of thalamic gustatory and lingual areas in the rat. *Brain Res.* 92:123-129
- Oblinger, M.M. y Das, G.D. (1982). Connectivity of neural transplants in adult rats: Analysis of afferents and efferents of neocortical transplants in the cerebellar hemisphere. *Brain Res.* 249: 31-49
- Oblinger, M.M., Hallas, B.H. y Das, G.D. (1980). Neocortical transplants in the cerebellum of the rat: Their afferents and efferents. *Brain Res.* 189:228-32
- Olson, L., Backlund, E.D., Sedvall, G., Herrera-Marschitz, M., Ungerstedt, U., Stromberg, I., Hoffer, B. y Seiger, A. (1984). Intrastratial chromaffin grafts in experimental and clinical parkinsonism: first impressions. *Neuropharmacology and Central Nervous System.* Alan R. Liss, Inc. N.Y., pp. 195-201
- Ottersen, O.P. (1981). Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferents from the lower brain stem. *J. Comp. Neurol.* 202:335-356
- Ottersen, O.P. y Ben-Ari, Y. (1979). Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat .I. Projections from the thalamus. *J. Comp. Neurol.* 187:401-424

- Paul, K.G. (1963). 'Peroxidases', in the enzymes. Eds. P.D. Boyer, H. Lardy, and Myrback K. pp.227-274. Academic Press, New York
- Paxinos, G. y Watson, Ch. (1982). The rat brain; in stereotaxic coordinates. Academic Press.
- Phillipson, O.T. (1979). Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. J. Comp. Neurol. 187:117-144
- Piatt, J. (1940). Nerve-muscle specificity in Amblystoma, studied by means of heterotopic cord grafts. J. Exp. Zool. 85:211-241
- Price, J.L. y Amaral, D.G. (1981). An autoradiographic study of the projections of central nucleus of the monkey amygdala. J. Neurosci. 1:1242-1259
- Raisman, G. (1972). An experimental study of the projection of the amygdala to accessory olfactory bulb and its relationship to the concept of a dual olfactory system. Exp. Brain Res. 14:395-408
- Ranson, S.W. (1903). On the medullated nerve fibers crossing the site of lesions in the brain of the white rat. Journal Comp. Neurol. 13:185-207
- Ranson, S.W. (1914). Transplantation of the spinal ganglion, whit observations on the significance of the complex types of spinal ganglion cells. Journal Comp. Neurol. 24:547-558
- Rennke, H.G. y Venkatalacham, M.A. (1979). Chemical modification of horseradish peroxidase. J. Histochem. Cytochem. 27:1352-1353
- Ross, D.T. y Ebner, F.F. (1985). Neocortical transplants in the SI cortex of adult mice receive thalamic afferents from the posteromedial (POM) but not the ventrobasal (VB) nucleus. Soc. Neurosci. Abstr. Part 2, ppXXX
- Saltikow, S. (1905). Versche uber gehirnpplantation, zugleich ein beitrug zur kenntniss der vorgange an der zelligen gehirne-elementis. Arch. Psychiatr. Nervenky. 40:329-388
- Saper, C.B. (1982). Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. Brain Res. 197:291-317
- Saper, C.B. y Loewy, A.D. (1980). Amygdaloid and pontine projections to the ventromedial nucleus of the hypothalamus. J. Comp. Neurol. 174:377-396

- Sarter, M. y Markowitsch, H.J. (1985). Involvement of the amygdala in learning and memory: a critical review, with emphasis on anatomical relations. *Behav. Neurosci.* 99:342-380
- Scalia, F. y Colman, D.R. (1974). Aspect of the central projection of the optic nerve in the frog as revealed by anterograde migration of HRP. *Neurosci. Lett.* 24:233-236
- Segal, M., Stenevi, U. y Bjorklund, A. (1981). Reformation in adult rats of functional septohippocampal connections by septal neurons regenerating across an embryonic hippocampal tissue bridge. *Neurosci. Lett.* 27:7-12
- Sharp, F.R. y González, M.F. (1985). Fetal cortex transplants attenuate thalamic atrophy caused by neonatal frontal cortex lesions: WGA-HRP and amino acid studies of connections between motor cortex and thalamus of neonatally lesioned rats with and without transplants. *Soc. Neurosci. Abstr. Part 2*, pp. XXX
- Shiosaka, S., Sakanaka, M., Inagaki, Sh. Senba, Y., Hara, Y., Takatsuky, K., Takagi, H., Kawai, Y. y Tohyama M. (1983). Putative neurotransmitters in the amygdaloid complex with special reference to peptidergic pathways. *Chemical Neuroanatomy*, edited by P.C. Emson, Raven Press. New York
- Shipley, M.T. (1982). Insular cortex projection to the nucleus of the solitary tract and brainstem visceromotor regions in the mouse. *Brain Res. Bull.* 8:139-148
- Siegel, A., Fukushima, T., Meibach, R., Burke, L., Edinger, H.I. y Weimer, S. (1977). The origin of afferent supply to the mediodorsal thalamic nucleus: enhancement of HRP transport by selective lesions. *Brain Res.* 135:11-23
- Silverman, W.F., Aravich, P.F., Collier, J.J. y Sladek, S.R. (1985). Synaptic innervation of grafted hypothalamic neurons by host catecholamine fibers in rats. *Soc. Neurosci. Abstr. Part 2* p.p XXX
- Singer, W., Hollander, H. y Vanegas, H. (1977). Decreased peroxidase labeling of lateral geniculate neurons following deafferentation. *Brain Res.* 120:133-137
- Sotelo, C. y Riche, D. (1974). The smooth endoplasmic reticulum and the retrograde and fast orthograde transport of horseradish peroxidase in the nigro-striatal loop. *Anat. Embryol.* 146:209-218
- Sperry, R.W. (1947). Effect of crossing nerves to antagonistic limb muscles in the monkey. *Arch. Neurol. Psychiatry.* 58:452-473
- Stenevi, U., Bjorklund, A. y Svendgaard, N. (1976). Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival. *Brain Res.* 114:1-20

- Stone, L.S. (1944). Functional polarization in retinal development and its reestablishment in regenerated retinae of rotated eyes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 57:13-14
- Stone, L.S. y Zaur, J.S. (1940). Reimplantation and transplantation of adult eyes in the salamander (*Triturus viridescens*) with return of vision. *J. Exp. Zool.* 85:243-70
- Staus, W. (1964). Factors affecting the cytochemical reaction of peroxidase with benzidine and the stability of the blue reaction products. *J. Histochem. Cytochem.* 12: 462-469
- Straznicky, K. 1963. Function of heterotopic spinal cord segments investigated in the chick. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 14:143-55
- Sunde N. y Zimmer, J. (1983). Cellular histochemical and connective organization of the hippocampus and fascia dentata transplanted to different regions of immature and adult rat brains. *Dev. Brain Res.* 8:165-91
- Székely, G. (1963). Functional specificity of spinal cord segments in the control of limb movements. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 11:431-44
- Székely, G. (1968). Development of limb movements: embryological, physiological and model studies. In growth of the Nervous System. ed. G.E.W. Wolstenholme, M. O'Connor pp. 77-93. London
- Turner, P.T. (1977). Effect of pentobarbital on uptake of horseradish peroxidase by rabbit cortical synapses. *Exp. Neurol.* 54:24-32
- Turner, P.T. y Harris, A.B. (1974). Ultrastructure of exogenous peroxidase in cerebral cortex. *Brain Res.* 74:305-326
- Vacca, L.L., Rosario, S.L., Zimmerman, E.A., Tomaskofsky, P., Ng, P.Y. y Husu, K.C. (1975). Application of immunoperoxidase techniques to localize horseradish peroxidase tracer in the central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.* 23:208-215
- Vanegas, H., Hoijander, H. y Distel, H. (1978). Early stages of uptake and transport of horseradish peroxidase by cortical structures, and its use for the study of local neurons and their processes. *J. Comp. Neurol.* 177:193-212
- Voshart, K. y Van der Kooy, D. (1981). The organization of the efferent projections of the parabrachial nucleus to the forebrain in the rat: A retrograde fluorescent double labeling study. *Brain Res.* 212:271-286

- Walberg, F., Brodal, A. y Hoddevik, G.H. (1976). A note on the method of retrograde transport of horseradish peroxidase as a tool in studies of afferent cerebellar connections particularly those from the inferior olive; with comments on the orthograde transport in Purkinje cell axons. *Exp. Brain Res.* 24:483-501
- Weiss, P.A. (1950). The deplantation of fragments of nervous system in amphibians. I. Central reorganization and the formation of nerves. *J. Exp. Zool.* 113:397-462
- Wiegand, S.J. y Gash, D.M. (1985). Anterior hypothalamic transplants: identification of parvicellular neural populations derived from the anlagen of the suprachiasmatic and paraventricular nuclei. *Soc. Neurosci. Abstr.* Vol. 11, Part 2, pp. XXX
- Wolf, N.J. y Butcher, L.L. (1982). Cholinergic projections to the basolateral amygdala: A combined evans blue and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res. Bull.* 8: 751-763
- Wujek, J.R. y Reier, P.R. (1984). Astrocytic membrane morphology: differences between mammalian and amphibian astrocytes after axotomy. *J. Comp. Neurol.* 222:607-619
- Yamamoto, T. y Kawamura, Y. (1972). Summated cerebral responses to taste stimuli in rat. *Physiol. Behav.* 9:789-793
- Yamamoto, T. Yuyama, N. y Kawamura, Y. (1981). Cortical neurons responding to tactile, thermal and taste stimulations of the rat's tongue. *Brain Res.* 221:202-206
- Zimmer, J., Sunde, N. y Sorensen, T. (1985). Specific restoration of hippocampal nerve connections by dentate granule cells transplanted to X-irradiated rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* Vol. 11, Part 2, pp. XXX

No nos preguntamos que propósito útil hay en el canto de los pájaros, cantar es un deseo desde que fueron creados para cantar. Del mismo modo no debemos preguntarnos por qué la mente humana se preocupa por penetrar los secretos de los cielos...la diversidad de los fenómenos de la Naturaleza es tan grande y los tesoros que encierran los cielos tan ricos, precisamente para que la mente del hombre nunca se encuentre carente de su alimento básico.

Johannes Kepler