

1978
1978



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Consecuencias conductuales, histológicas y
bioquímicas de inmunolesionar específicamente con
la toxina 192 IgG-saporina células colinérgicas que
poseen el receptor del factor de crecimiento neuronal
de baja afinidad p75 en el Núcleo Basal
Magnocelular en Rata.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

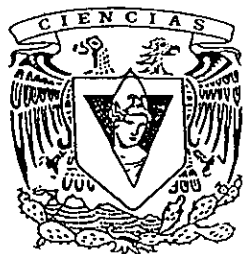
B I O L O G A

P R E S E N T A:

JIMENA ESTRADA ZEPEDA

ASESOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMUDEZ RATTONI

MEXICO, D. F.



2000
281435



Universidad Nacional
Autónoma de México

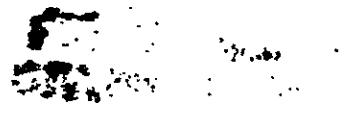


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Consecuencias conductuales, histológicas y bioquímicas de inmunolesionar específicamente con la toxina 192 IgG-saporina células colinérgicas que poseen el receptor del factor de crecimiento neuronal de baja afinidad p75 en el núcleo basal magnocelular en rata, realizado por Jimena Estrada Zepeda

con número de cuenta 9034167-0, pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director de Tesis
- Propietario DR. Federico Bermúdez Rattoni
- Propietario DRA. María Eugenia Gonsebatt
- Propietario DR. Julio Morán Andrade
- Suplente Mtro. Humberto Gutiérrez González
- Suplente Biol. Julio Prieto Sagredo

[Handwritten signatures and initials]

FACULTAD DE CIENCIAS
 U.N.A.M.

Edna María Suárez Díaz
 Consejo Departamental de BIOLOGIA
 DRA. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
 DE BIOLOGIA

Con todo mi amor para mi familia: Juan , Lupita , Nube, Maru y Ian.
Imprescindibles.

AGRADECIMIENTOS:
FEDERICO BERMUDEZ
HUMBERTO GUTIERREZ
COMPAÑEROS DEL LABORATORIO 201 Y 203.

A los amigos y familiares siempre presentes.

Indice

1. Introducción.	1
2. Relación de la acetilcolina con funciones cognitivas.	3
3. Neuroanatomía de la acetilcolina.	11
3.1 Distribución de las neuronas colinérgicas.	12
3.2 Características de las terminales colinérgicas en el SNC.	13
3.3 Aferencias hacia células colinérgicas.	13
3.4 Proyecciones de las neuronas del NBM.	14
3.5 Configuración anatómica del sistema colinérgico en una sola red.	14
3.6 Interconexiones en la red colinérgica.	15
3.7 Caracterización de los impulsos eléctricos en la red.	15
3.8 Los factores tróficos y su relación con las neuronas colinérgicas.	16
3.8.1 EL NGF y la relación con el sistema colinérgico.	16
3.9 El sistema colinérgico como posible integrador.	18
4. Trabajos de lesiones en el Núcleo Basal Magnocelular.	19
5. La inmunotoxina 192 IgG-saporina	22
6. El problema de investigación.	25
7. Procedimientos experimentales.	25
7.1 Sujetos.	25
7.2 Análisis bioquímico: microdiálisis.	26
7.3 Análisis histológico.	29
7.3.1 Técnica de acetilcolinesterasa.	29
7.3.2 Técnica de DFP.	30
7.4. Estudio de conectividad.	30
7.5 Estudio conductual.	32
8. Resultados.	33
8.1 Resultado del estudio de microdiálisis.	33
8.2 Resultados del análisis histológico.	34
8.2.1 Acetilcolinesterasa.	34
8.2.2 DFP.	35
8.3 Resultado del estudio de conectividad.	36
8.4 Resultado del estudio conductual.	38
Discusión	
9. Efecto de la inmunotoxina 192 IgG-saporina.	38
10. Conclusiones.	40
Referencias.	41

Consecuencias conductuales, histológicas y bioquímicas de inmunolesionar específicamente con la toxina 192 IgG-saporina células colinérgicas que poseen el receptor del factor de crecimiento neuronal de baja afinidad p75 en el Núcleo Basal Magnocelular en rata.

1.Introducción.

Un interesante problema en neurociencias es el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria. En este sentido, en las últimas décadas se han generado evidencias sobre la relación de los sistemas colinérgicos con estos procesos. El primer capítulo de este trabajo está dedicado a mostrar las evidencias de la relación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) con funciones cognitivas.

Entre los componentes del sistema colinérgico se encuentra el del cerebro basal anterior el cual proyecta fibras colinérgicas hacia muchas regiones cerebrales, entre ellas el manto cortical, el hipocampo y la amígdala (Bigl et al 1982). Al sistema colinérgico se dedica el segundo capítulo en donde se señalan los componentes anatómicos.

La herramienta que se ha utilizado para diseccionar la participación de las neuronas del cerebro basal anterior en los procesos de aprendizaje y memoria han sido la lesión excitotóxica.

Los experimentos de lesiones excitotóxicas en el núcleo basal magnocelular (NBM), han mostrado déficits de aprendizaje (Sinden et al 1995, Wenk et al 1996). Estos déficits son atribuidos al daño en la transmisión colinérgica del NBM hacia la corteza. Sin embargo en otros estudios se mostró que la disminución de la colín-acetiltransferasa (ChAT) cortical después de lesiones excitotóxicas en el NBM no está relacionada con el impedimento cognitivo (Beninger et al 1994, Dunnett et al 1987, Mallet et al 1995). Una revisión de los trabajos de lesiones en el NBM, la presentamos en el tercer capítulo de este trabajo.

En estudios posteriores se mostró que la disminución de neuronas del cerebro basal anterior que portan el receptor del factor de crecimiento neuronal (NGF) corresponde con la pérdida selectiva de la inervación colinérgica cortical después de inyecciones intracerebrales de la reciente inmunotoxina 192 IgG-saporina (Book et al 1994, Wiley et al 1992).

Los experimentos que han utilizado esta inmunotoxina no han podido reproducir los déficits de aprendizaje y memoria encontrados con las lesiones excitotóxicas. Esto pone en duda la idea de que la entrada de acetilcolina (ACh) en la corteza tiene un efecto directo en la formación de la memoria (Baxter et al 1995, Berger-Sweeney et al 1994, Torres et al 1994, Waite y Thal 1996, Wenk et al 1996, Wenk et al 1994).

En el presente trabajo utilizamos un paradigma de aprendizaje mediado corticalmente, el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) para determinar la probable participación de la vía colinérgica NBM-corteza en el aprendizaje. El CAS es un modelo ampliamente usado para el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria (Bermúdez-Rattoni y Yamamoto 1998). En este modelo conductual el animal adquiere una aversión a un estímulo novedoso al ser este último seguido de un malestar gástrico. Los substratos anatómicos de este paradigma han sido establecidos (Kiefer 1985, Bermúdez-Rattoni y Yamamoto 1998), encontrándose que la corteza insular es el único sitio cortical directamente involucrado en la adquisición y retención del CAS (Kiefer y Brown 1979, Yamamoto et al 1980, Aggleton et al 1981, Braun et al 1982, Kiefer 1985).

En el cuarto capítulo se muestran los trabajos que sostienen que la inmunotoxina 192 IgG-saporina es una herramienta selectiva para examinar la participación de las fibras colinérgicas que portan el receptor para el NGF en paradigmas conductuales.

En este capítulo se discute la falta de selectividad de las lesiones excitotóxicas como un problema que produce interpretaciones conductuales confusas debido al daño en estructuras vecinas cerebrales. Este problema es el que genera la presente investigación, en la cual se pretende aclarar estas discrepancias.

Posterior a esta revisión se plantea la hipótesis que condujo el presente estudio, se describen los resultados que produjo y finalmente se evalúan estos resultados con respecto a la literatura revisada.

2.Relación de la acetilcolina con funciones cognitivas.

El estudiar la relación de la acetilcolina con funciones cognitivas dará un acercamiento a procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje.

La manera en como se estudia un fenómeno en particular, es casi siempre, descomponiéndolo en subconjuntos, esto con el objeto de simplificar el problema.

Los experimentos que han utilizado esta inmunotoxina no han podido reproducir los déficits de aprendizaje y memoria encontrados con las lesiones excitotóxicas. Esto pone en duda la idea de que la entrada de acetilcolina (Ach) en la corteza tiene un efecto directo en la formación de la memoria (Baxter et al 1995, Berger-Sweeney et al 1994, Torres et al 1994, Waite y Thal 1996, Wenk et al 1996, Wenk et al 1994).

En el presente trabajo utilizamos un paradigma de aprendizaje mediado corticalmente, el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) para determinar la probable participación de la vía colinérgica NBM-corteza en el aprendizaje. El CAS es un modelo ampliamente usado para el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria (Bermúdez-Rattoni y Yamamoto 1998). En este modelo conductual el animal adquiere una aversión a un estímulo novedoso al ser este último seguido de un malestar gástrico. Los substratos anatómicos de este paradigma han sido establecidos (Kiefer 1985, Bermúdez-Rattoni y Yamamoto 1998), encontrándose que la corteza insular es el único sitio cortical directamente involucrado en la adquisición y retención del CAS (Kiefer y Brown 1979, Yamamoto et al 1980, Aggleton et al 1981, Braun et al 1982, Kiefer 1985).

En el cuarto capítulo se muestran los trabajos que sostienen que la inmunotoxina 192 IgG-saporina es una herramienta selectiva para examinar la participación de las fibras colinérgicas que portan el receptor para el NGF en paradigmas conductuales.

En este capítulo se discute la falta de selectividad de las lesiones excitotóxicas como un problema que produce interpretaciones conductuales confusas debido al daño en estructuras vecinas cerebrales. Este problema es el que genera la presente investigación, en la cual se pretende aclarar estas discrepancias.

Posterior a esta revisión se plantea la hipótesis que condujo el presente estudio, se describen los resultados que produjo y finalmente se evalúan estos resultados con respecto a la literatura revisada.

2.Relación de la acetilcolina con funciones cognitivas.

El estudiar la relación de la acetilcolina con funciones cognitivas dará un acercamiento a procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje.

La manera en como se estudia un fenómeno en particular, es casi siempre, descomponiéndolo en subconjuntos, esto con el objeto de simplificar el problema.

La forma de disecar el problema en subconjuntos, depende en gran medida de nuestros objetivos. El presente estudio se iniciará con la acetilcolina, ya que se sabe tiene relación con los procesos de aprendizaje y memoria.

Los primeros acercamientos hacia la bioquímica del aprendizaje y la memoria comienzan con estudios utilizando modelos en invertebrados. Estas investigaciones dieron las primeras ideas electrofisiológicas, moleculares, y del desarrollo del aprendizaje y la memoria. La idea de la relación entre la acetilcolina (Ach) y la conducta tiene su origen a mediados de los años 20, cuando es descubierta como neurotransmisor en el sistema nervioso. Esta idea cobra un papel importante con el descubrimiento de la enfermedad de Alzheimer, en donde se asocia la pérdida de la memoria con la pérdida de neuronas que sintetizan Ach. Estos dos descubrimientos abren camino en la investigación con la influencia de la Ach en el funcionamiento de la memoria. Los efectos de las sustancias potenciadoras de la memoria, que interfieren con la degradación de la Ach y de las sustancias que actúan como agonistas colinérgicos han sido observadas en una amplia variedad de paradigmas conductuales (Brinton, 1991).

La acetilcolina es un neurotransmisor de bajo peso molecular que se elabora a partir de la colina, la cual obtenemos de la dieta y de la acetil-coenzima A (ver fig.1).

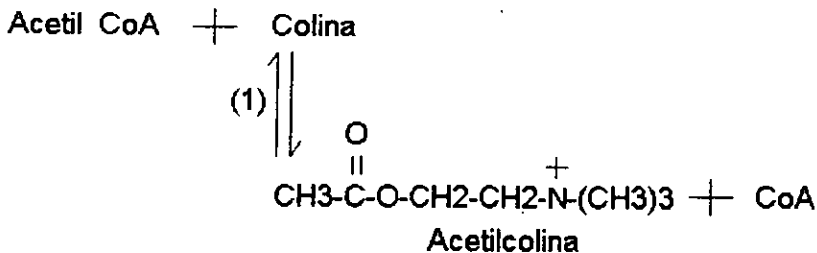


Fig. 1 La vía biosintética de la acetilcolina tiene una sola reacción enzimática (1), catalizada por la colin-acetiltransferasa (ChAT). La enzima que degrada a la acetilcolina es la acetilcolinesterasa. La acetilcolina es utilizada en muchas sinapsis en todo el cerebro. En particular en el núcleo basal de Meynert (llamado magno celular en la rata) hay muchos cuerpos celulares que la sintetizan y estas neuronas tienen proyecciones difusas hacia la corteza cerebral (Tomado de Kandel et al 1991).

El sistema que interesa en este estudio es el sistema colinérgico por que existen fuertes evidencias de que está involucrado en el almacenamiento de la memoria. (Bartus et al 1985, citado por McGaugh 1989).

Las herramientas para diseccionar la red colinérgica pueden ser ciertos fármacos que al tener efectos conductuales nos pueden revelar características del sistema en el que estamos interesados en este caso memoria y aprendizaje. Así, la utilidad de un fármaco depende directamente de la selectividad con la que afecte un sistema biológico dado, en este caso, los sistemas colinérgicos. Ahora veamos que características o principios tiene la memoria: tales como los cambios en el tiempo, los procesos que podrían estar involucrados, sus relaciones con otras funciones, la naturaleza y organización de los sistemas cerebrales que participan en la formación, desarrollo y expresión de la memoria (Squire y Davis 1981). Desde esta perspectiva, vemos por qué entre más amplio el rango de efecto de un fármaco en el comportamiento menor es su utilidad. El análisis farmacológico de la memoria puede ser entendido en el contexto de los esfuerzos para apreciar los eventos bioquímicos, neurofisiológicos y anatómicos que influyen en el almacenamiento de la memoria (Squire y Davis 1981), esfuerzos que están dentro del enorme campo de las neurociencias. En este sentido, los principales conceptos que han guiado las investigaciones neurobiológicas sobre la memoria son:

- i) Sistemas neurales extrínsecos o intrínsecos. (Los sistemas intrínsecos se refieren a las vías en donde las representaciones de información se desarrollan. El sistema extrínseco se refiere a las vías que pueden influenciar el desarrollo, mantenimiento o expresión de la memoria).
- ii) El concepto de modulación.
- iii) Distinción entre mecanismos de almacenamiento a largo y corto plazo.
- iv) El concepto de consolidación. (La consolidación es el proceso por el cual la resistencia al rompimiento se desarrolla gradualmente después del aprendizaje) (Squire y Davis 1981).

Existen en la literatura datos sobre los efectos de anticolinérgicos en la memoria de tareas previamente aprendidas. Los resultados de estos experimentos sugieren que el almacenamiento de la memoria involucra en parte una secuencia de cambios en la eficacia de la transmisión de las sinapsis colinérgicas y esta se desarrolla con respecto al tiempo, después del aprendizaje de la tarea (Deutsch 1971, Squire y Davis 1981).

Para que una tarea se recuerde por semanas, se ha pensado que lo que ocurre después del aprendizaje, es un incremento gradual de la eficacia sináptica y un decremento de esta eficacia durante el curso natural del olvido. De esta manera, si la fisostigmina es administrada después del aprendizaje, eleva la eficacia de la transmisión colinérgica por arriba de los niveles óptimos impidiendo así la ejecución de la tarea. Cuando es administrada durante el curso natural del olvido se ha propuesto que eleva la eficacia de la transmisión al nivel óptimo, permitiendo así el recuerdo.

Estos trabajos se han replicado y expandido sugiriendo en conjunto que los cambios sinápticos ocurren gradualmente después del aprendizaje y el curso de tiempo en que éstos suceden está relacionado con el curso natural de la memoria. Esta idea está apoyada por los estudios de pacientes con amnesia, en donde la observación clínica ha confirmado que la amnesia retrógrada puede afectar memorias formadas pocos años antes, sin afectar memorias más antiguas. Con ello se piensa que la memoria cambia gradualmente durante los años posteriores al aprendizaje, siendo así, cada vez más resistente a la alteración (Squire y Davis 1981) (ver fig. 2).

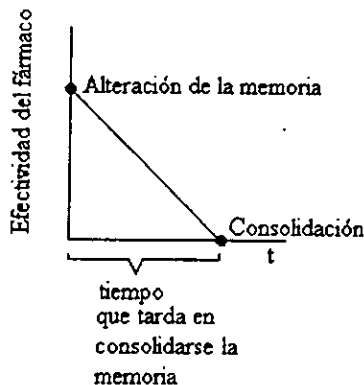


Fig.2 El concepto de consolidación se toma como el proceso en el cual la resistencia a la alteración se desarrolla gradualmente después del entrenamiento.

Los resultados de ciertos estudios de pacientes con la enfermedad de Alzheimer sugieren la posibilidad de que la enfermedad afecte selectivamente neuronas colinérgicas. Con ello, surge la siguiente pregunta: ¿la administración de fármacos colinérgicos puede retrasar la disminución de las funciones cognitivas asociadas con

esta enfermedad?. Con éstos estudios, aún no se puede concluir acerca de la posible utilidad de los fármacos colinérgicos (Squire y Davis 1981).

Para resumir estos estudios es útil considerar los estudios con animales que primero demostraron que los efectos de fármacos colinérgicos están determinados en gran medida por la dosis y por la edad de la memoria. Los trabajos dedicados al estudio de fármacos colinérgicos se ven, con ello obligados a tratar con estas dos variables. En estos trabajos, ya se había puntualizado que las dosis terapéuticas adecuadas debían ser seleccionadas para cada paciente. Por ello, el mejoramiento de la memoria en sujetos normales con fármacos colinérgicos no es viable debido a que las dosis que mejoran el recuerdo de un tipo de memorias impiden el recuerdo de otras.

Dada la gran cantidad de evidencia que sugiere un papel importante en el sistema colinérgico en la memoria y aprendizaje en humanos, se pueden distinguir tres áreas de investigación que han conducido al desarrollo de la hipótesis colinérgica:

- a) Los estudios utilizando anticolinérgicos en voluntarios humanos normales.
- b) El examen directo del estado del sistema colinérgico en sujetos con desórdenes en memoria y déficits en aprendizaje.
- c) Intentos de mejorar la memoria y función cognitiva con fármacos en sujetos normales y en pacientes con disfunciones. (Davies 1985).

En cuanto al inciso a, se ha demostrado que al utilizar dosis bajas de escopolamina en voluntarios jóvenes demuestran déficits importantes en el funcionamiento de la memoria, con déficits menores en otros aspectos de las funciones cognitivas (Drachman y Leavitt 1974, Drachman y Sahakian 1980). La escopolamina es el fármaco utilizado más frecuentemente en estudios de este tipo ya que sus efectos son reproducibles. Lo que se debe considerar ahora es si es posible modelar los trastornos de la memoria con anticolinérgicos. El factor que nos impide esto en gran medida es la gran complejidad del sistema colinérgico.

La administración de fármacos anticolinérgicos tiene los siguientes problemas:

- i) Pueden interferir con más de uno de estos tres grupos de neuronas colinérgicas
- ii) Afectar otras regiones del cerebro
- iii) Afinidad del fármaco
- iv) Variaciones regionales de la actividad basal del sistema. En otras palabras, tenemos que saber con exactitud la actividad del sistema en los tiempos que nos interesan para poder estimar así el efecto del fármaco que estamos utilizando.

Teniendo en cuenta los problemas anteriores se puede ver porque el uso de drogas para diseccionar el papel del sistema colinérgico en memoria y aprendizaje es complejo. Aún con estas dificultades, a través del uso de anticolinérgicos los datos son consistentes en que el sistema colinérgico juega un papel en la memoria humana y en las funciones cognitivas (Davies 1985).

En cuanto al inciso b, sobre análisis del sistema colinérgico en sujetos con desórdenes en memoria y déficits en aprendizaje, existe evidencia de disfunción colinérgica en trastornos humanos, involucrando pérdida de la memoria y déficits cognitivos en la enfermedad de Alzheimer. En estos estudios se ha encontrado una marcada deficiencia colinérgica. Es interesante notar que esta deficiencia colinérgica está limitada al núcleo basal de Meynert y la banda diagonal de Broca. La interpretación de la relación entre el déficit colinérgico y los síntomas de la enfermedad es difícil ya que podemos pensar que el déficit es sólo indicativo de la severidad de la enfermedad y no de la implicación causal (Davies 1985). Entonces, ¿cómo establecer el papel del sistema colinérgico en la función cognitiva a partir de estudios de tejido cerebral?. Este problema se ha tratado de resolver haciendo correlaciones entre la actividad de la ChAT y el déficit cognitivo y se ha encontrado que la baja actividad de la ChAT en más de una región cortical es la mejor predicción para casos de demencia. Se ha visto también que los efectos de las lesiones en la función cognitiva son altamente dependientes de la localización de la lesión (Davies 1985). Aunque los análisis de estos resultados apoyan la hipótesis esencial de que con disfunciones colinérgicas la cognición es imposible, se ha demostrado que existen otros factores involucrados. Se tienen además pacientes con problemas de demencia en donde la actividad de la ChAT está en los valores normales. Aún no está claro qué es lo que sucede en estos casos. A partir de los trabajos realizados se puede concluir que una transmisión colinérgica anormal resulta inevitablemente en demencia pero ésta no siempre se debe a la transmisión colinérgica anormal. Con lo anterior se sugiere que los déficits en el sistema colinérgico contribuyen a la generación de la demencia (Davies 1985).

Para terminar con estas tres áreas de investigación, veamos el punto c) acerca de los intentos de mejorar la memoria y función cognitiva con fármacos en sujetos normales y en pacientes con disfunciones. Hasta este momento existe sólo un fármaco que produce mejoras significativas en pacientes con Alzheimer y ésta es la fisostigmina.

El hecho de la existencia de un solo fármaco tiene que ver con la dificultad de manipular la transmisión colinérgica central en humanos debido a su naturaleza

extendida. Niveles altos o bajos de acetilcolina con respecto a los basales en una sinapsis resultan igual de ineficientes en la actividad fisiológica.

Lo que es necesario es un agente o la combinación de agentes que aumenten selectivamente la transmisión colinérgica. Al no existir éstos no podemos afirmar que la pérdida de memoria y la disfunción cognitiva en pacientes con Alzheimer sean causas de la deficiencia en la transmisión colinérgica. Pero a partir de lo anterior se puede concluir que, si existe un neurotransmisor clave para las funciones de memoria y para otros aspectos de las funciones cognitivas entonces éste podría ser la acetilcolina (Davies 1985).

Existe evidencia posterior de que otros sistemas, como los noradrenérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos gabaérgicos y de somatostatina decaen también con la enfermedad de Alzheimer, pero la reducción más marcada de células, ocurre claramente en el núcleo basal de Meynert y en el septum, los cuáles se conocen por proveer de proyecciones colinérgicas a otras regiones cerebrales incluyendo la corteza y el hipocampo (McGaugh 1989).

Los estudios de Stratton y Petrinovich (1963) confirmaron que la retención es otenciada por inyecciones sistémicas de dosis bajas de fisostigmina que es un inhibidor de la acetilcolinesterasa. Efectos potenciadores de la memoria también han sido encontrados dentro de una amplia variedad de paradigmas conductuales incluyendo la prevención pasiva (McGaugh 1989).

Estos hallazgos sostienen que la acetilcolina liberada por el entrenamiento está involucrada en la modulación del almacenamiento de la memoria. Se ha reportado también que agonistas muscarínicos como la arecolina y la oxotremorina administrados sistémicamente después del entrenamiento tienen efectos potenciadores en la retención (Baratti et al 1984, Flood et al 1981). Estos efectos de los agonistas colinérgicos son dependientes de la dosis y del tiempo (McGaugh 1989).

Descubrimientos importantes son, también los guiados por fármacos que al administrarse solos no tienen ningún efecto, pero al administrarse con otro, potencia los efectos de estos últimos, este fenómeno es conocido como un efecto sinérgico. Aún no se han diseñado experimentos con el fin de averiguar las bases de estos efectos sinérgicos. (McGaugh 1989).

Es claro que inyecciones de antagonistas colinérgicos, como la escopolamina producen impedimentos en la retención dependientes de la dosis, cuando son administrados previo al entrenamiento (Flood y Cherkin 1986). Estos hallazgos pueden

deberse a influencias en procesos diferentes a los del almacenamiento de la memoria. Mientras muchos investigadores han encontrado que la retención en una variedad de tareas es impedida por la administración de antagonistas colinérgicos posterior al entrenamiento (Flood y Cherkin 1986, Baratti et al 1984) otros investigadores no han encontrado impedimentos significativos en la retención con inyecciones posteriores al entrenamiento (Hagan et al 1986). En general, los estudios que han encontrado impedimentos en la retención con inyecciones de antagonistas colinérgicos posteriores al entrenamiento han usado dosis mayores que aquellas requeridas para producir impedimentos con inyecciones previas al entrenamiento. Las bases de éstos hallazgos no son claras. La mayoría de los trabajos recientes de investigación que están preocupados por las influencias colinérgicas en la memoria están motivados por el interés de encontrar y desarrollar tratamientos con drogas, apropiados para la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos de la memoria en la cual la función colinérgica está impedida. La suposición general que subyace a éstas investigaciones es que podría ser posible restablecer la transmisión colinérgica a través del uso de inhibidores de la colinesterasa, agonistas colinérgicos, u otros fármacos. Este punto de vista ha sido animado por hallazgos que sugieren que la fisostigmina puede producir ligeras mejoras en la memoria, en algunos pacientes con Alzheimer (Davis et al 1983). Muchos investigadores han intentado desarrollar un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer, lesionando el núcleo colinérgico del cerebro anterior en ratas. Aunque estas lesiones no reproducen las innumerables alteraciones biológicas vistas en la enfermedad de Alzheimer, si impiden aprendizaje y retención en una amplia variedad de tareas. Este impedimento es potenciado por la escopolamina. Es importante, para la suposición de que las drogas podrían ser efectivas en el tratamiento de trastornos resultado del deterioro colinérgico, el que algunos estudios hayan reportado el hallazgo de que el déficit en aprendizaje inducido por lesiones en el cerebro basal anterior pueden ser atenuadas por la fisostigmina administrada antes o después del entrenamiento. Con esto, es posible que en animales con deterioro en el funcionamiento del NBM, se requiera el restablecimiento de la función colinérgica para la atenuación del deterioro de la memoria (McGaugh 1989).

Los hallazgos anteriores sugieren un papel importante del sistema de transmisión colinérgico en los procesos de almacenamiento de la memoria.

3. Neuroanatomía de la acetilcolina.

Estudiando la neuroanatomía de la acetilcolina podremos situar la vía colinérgica nbn-corteza, que interesa en este estudio dentro del sistema colinérgico global al cual pertenece. Esta vía colinérgica es importante ya que como señalamos anteriormente parece tener un papel importante en procesos cognitivos.

Observándolos como un todo, los sistemas colinérgicos centrales forman un agregado continuo de neuronas, que es más extenso que cualquier otro, en el sistema nervioso central de mamífero. Las neuronas que utilizan acetilcolina como neurotransmisor son sólo unos pocos millones de los billones de neuronas estimadas en el sistema nervioso central de mamífero. Las células colinérgicas controlan regulan o modulan casi todos los músculos, órganos glándulas y regiones neurales. Además, los mecanismos colinérgicos intervienen en casi todos los comportamientos, tanto neurales como manifiestos (Woolf 1991).

Las neuronas colinérgicas que van desde la médula espinal hasta el cerebro anterior presentan características arquitectónicas que si las observamos con cuidado, nos sugerirían la capacidad de mediar comportamientos complejos. Los subsistemas colinérgicos (ej. cerebro basal anterior, estriado, pontomesencéfalo y neuronas motoras) pueden ser considerados como entidades funcionales globales sobre la base de las conexiones. Las neuronas colinérgicas están interconectadas, sin importar la distancia que exista entre ellas. A través de estas conexiones cada subsistema colinérgico recibe de manera colectiva una serie completa de información sensorial Este patrón de conectividad, provee de un substrato anatómico para la integración global de la información relevante de las complejas funciones llevadas a cabo por los sistemas colinérgicos de mamífero (Woolf 1991).

Las neuronas que contienen la ChAT son generalmente consideradas como colinérgicas. En la gran mayoría de los casos, las neuronas que reaccionan inmunohistoquímicamente a anticuerpos monoclonales o policlonales producidos contra la ChAT, corresponden a las mismas neuronas que por métodos alternativos se ha demostrado que son colinérgicas. En general las células positivas para ChAT tiñen también para la acetilcolinesterasa (Bigl et al 1982). Por otra parte las conexiones anatómicas trazadas por neuronas inmunopositivas para ChAT corresponden en general a vías colinérgicas señaladas por medidas bioquímicas de la actividad de ChAT, toma de la colina y liberación de la acetilcolina (Woolf et al 1984, Woolf y Butcher 1986).

3.1 Distribución de las neuronas colinérgicas.

Es generalmente aceptado que existen dos grandes grupos de neuronas colinérgicas:

- i) Neuronas del cerebro basal anterior dentro del núcleo septal medial.
- ii) Neuronas del miembro vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca y el núcleo basal magnocelular (nbm), también llamado núcleo basal de Meynert en seres humanos. (Everitt y Robbins 1997) (ver fig. 3).

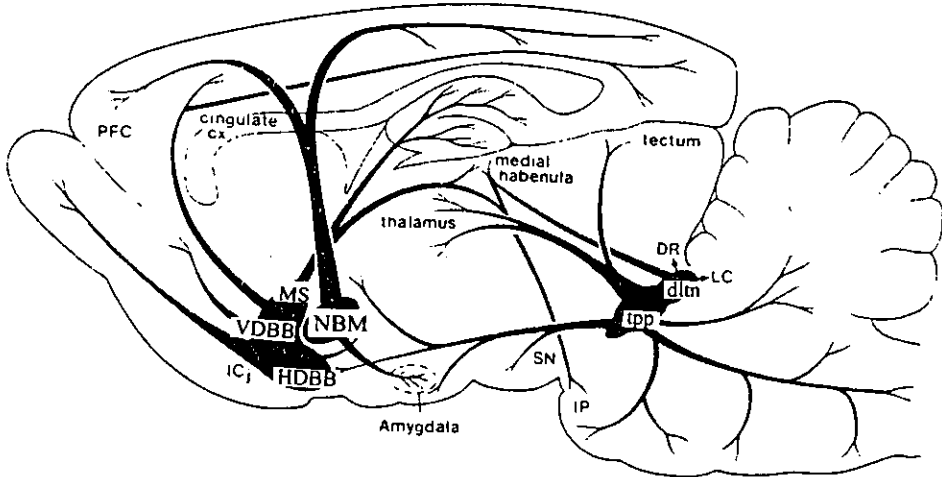


Fig. 3 Esquema de la distribución de las neuronas colinérgicas y sus proyecciones en el cerebro de rata. Abreviaturas: MS, septum medial; VDBB, núcleo del miembro vertical de la banda diagonal de Broca; HDBB, núcleo del miembro horizontal de la banda diagonal de Broca; NBM, núcleo basal magnocelular; tpp, núcleo pedunculopontino tegmental; dltm, núcleo laterodorsal tegmental; PFC, corteza prefrontal; SN, substantia nigra; IP, núcleo interpeduncular; DR, dorsal raphé; LC, locus ceruleus (Tomado de Everitt y Robbins 1997).

La región del cerebro basal anterior parecen ser las únicas regiones que contienen cuerpos celulares que se presentan de manera uniforme a lo largo de diferentes especies de mamíferos. Parece ser que a través del sistema nervioso, las neuronas colinérgicas están dispersas de manera irregular en lugar de estar localizadas en núcleos discretos (Woolf 1991).

Se ha demostrado por inmunocitoquímica para ChAT que los cuerpos celulares colinérgicos forman columnas continuas que comprenden el telencéfalo y diencefalo basal, tallo cerebral y médula espinal. Dondequiera que acabe un grupo de células colinérgicas comienza otro. Entre éstos grupos no existen límites bien definidos, sino

que están entrelazados (Woolf 1991). Esta organización colinérgica en continuo es ya muy conocida (Bigl et al 1982, Woolf et al 1984 citados por Woolf 1991).

Entre cada célula colinérgica existen numerosas dendritas sobrepuestas que proporcionan numerosos puntos de intersección, esto produce una magnífica conexión entre neuronas adyacentes, si este patrón lo vemos en una escala superior, lo que resulta en una fina interconexión entre los diferentes subsistemas colinérgicos. Con esto vemos que desde la región rostral hasta la región caudal, todas las células colinérgicas en el sistema nervioso central de mamífero parecen estar unidas en complejo unificado de subsistemas contiguos (Woolf 1991).

3.2 Características de las terminales colinérgicas en el SNC.

Las células positivas a ChAT tienen proyecciones interneuronales intrínsecamente organizadas dentro de la sustancia gris. Las células positivas a ChAT que muestran proyecciones hacia otras regiones están embebidas típicamente en tractos de fibras los cuáles proveen un conducto para que las fibras colinérgicas alcancen sus sitios blanco. Un número relativamente pequeño de las células colinérgicas inerva cada región neural (Woolf 1991).

Casi todas las regiones neurales del cerebro de mamífero está inervado por un grupo contiguo de células colinérgicas, que en la mayoría de los casos, derivan de un solo núcleo ó subsistema. El manto cerebral en su totalidad está inervado por neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior, pero son pocas las proyecciones colinérgicas que descienden de ésta área (Woolf 1991).

3.3 Aferencias hacia células colinérgicas.

Es común que los grupos de células colinérgicas proyecten hacia otros grupos colinérgicos. Las células colinérgicas reciben solamente un pequeño número de entradas de cualquier fuente, sin tener en cuenta si existe una gran o pequeña distancia entre el grupo de células colinérgicas y la neurona aferente. La ocurrencia repetida de éste fenómeno sugiere que algún proceso indeterminado subyacente podría ser responsable de la escasa distribución de las fuentes individuales de entradas hacia las neuronas colinérgicas (Woolf 1991).

3.4 Proyecciones de las neuronas colinérgicas del NBM

Las áreas rostrales de la isocorteza como la corteza frontal están inervadas por células colinérgicas del NBM rostral y de la substancia innominata, mientras que la corteza parietal y la corteza temporal son sucesivamente inervadas por células colinérgicas caudales del NBM y el núcleo ansa lenticularis (Bigl et al 1982). Además de éste gradiente rostrocaudal, es evidente un gradiente mediocaudal, en el cual los grupos celulares del cerebro basal anterior localizados medialmente proyectan a regiones corticales mediales. Las células laterales del cerebro basal anterior proyectan casi exclusivamente hacia regiones corticales laterales (Bigl et al 1982). Los somas colinérgicos caudales del cerebro basal anterior parecen estar recíprocamente unidos con las regiones corticales que ellos inervan (Woolf 1991). Se encontró también que amplias regiones de las cortezas frontal, parietal y temporal presentaron el trazador retrógrado, después de infusiones en el NBM, en la substancia innominata y el núcleo ansa lenticularis (Woolf 1991).

Cada región isocortical, incluyendo las cortezas visuales y temporales, proyectan axones a las regiones adyacentes a las dendritas distales que surgen de las neuronas del cerebro basal anterior que proyectan también a las mismas regiones corticales (Saper 1984).

Con ello se tiene la base anatómica para explicar los efectos en el sentido fisiológico, donde se observa que las cortezas sensoriales primarias activan el cerebro basal anterior. La estimulación visual y auditiva produce incrementos arriba de los niveles basales en la cantidad de acetilcolina liberada específicamente en la corteza visual y auditiva respectivamente. Las proyecciones corticales visualés y auditivas hacia el cerebro basal anterior proveen las vías anatómicas que podrían causar estos efectos funcionalmente importantes. Los axones aferentes que se originan de las regiones isocorticales probablemente proveen de pocos contactos sinápticos en las dendritas individuales distales de las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior, lo que provoca que la detección inmunohistoquímica de éstas sinapsis sea muy difícil (Woolf 1991).

3.5. Configuración anatómica del sistema colinérgico en una sola red.

Un sistema colinérgico es un sistema simple, ya que contiene pocas células y pocas conexiones. Las conexiones entre las células colinérgicas parecen hablar de que la

importancia anatómica de las mismas no radica en los componentes celulares individuales sino en la configuración de toda la red (Woolf 1991).

El sistema colinérgico se compone de subsistemas, en los cuáles las células colinérgicas están conectadas de una manera particular: las dendritas distales de una neurona se comunican con las dendritas distales de otra neurona (Woolf 1991).

3.6 Interconexiones en la red colinérgica.

En los grupos celulares colinérgicos, son comunes las uniones estrechas y las sinapsis dendrodendríticas, éstas características son raras en el sistema nervioso central (SNC). Las sinapsis en las células colinérgicas del cerebro basal anterior se localizan en las dendritas distales. Las neuronas colinérgicas adyacentes están comúnmente interconectadas por conexiones axodendríticas y dendrodendríticas en sus procesos distales. Este patrón de conectividad podría mediar patrones de disparo coordinados entre neuronas colinérgicas adyacentes, contribuyendo así a una actividad basal dentro de los subsistemas colinérgicos y con capacidades de extenderse entre subsistemas contiguos (Woolf 1991).

En el humano existen de 1-2 células colinérgicas que inervan cada macrocolumna de la corteza cerebral (Wenk 1989, citado por Woolf 1981). Con ello es posible conformar un circuito recíproco basalocortical, en donde la proporción de células colinérgicas con respecto a las corticales que integran éste circuito es de 1/1000 (Woolf 1991). El hecho de que las neuronas colinérgicas estén interconectadas preferentemente en sitios distales incrementa su campo de acción (Woolf 1991).

3.7 Caracterización de los impulsos eléctricos en la red.

Aunque las entradas individuales son escasas y presumiblemente débiles, las entradas colectivas a cada subsistema colinérgico representan grandes y complejas series de información sensorial (Woolf 1991). Todas las regiones de la corteza proyectan axones cerca de las dendritas distales de las células del cerebro basal anterior, las cuáles inervan las mismas regiones corticales, esto permite el acceso de todo el manto cortical a la influencia colectiva del subsistema del cerebro basal anterior (Woolf 1991).

Cuando la información que se deriva de los diferentes dominios sensoriales llega a los sistemas colinérgicos, se produce una respuesta coordinada debido a sus patrones de interconexión. Las partes aisladas de la información sensorial pueden ser unidas en una sola debido a la intervención del sistema colinérgico. La activación puede extenderse por toda la red en una multitud de patrones espaciales y temporales, lo que ocasiona que

cada distribución sea única. Las conexiones recíprocas entre el sistema colinérgico y sus blancos produce circuitos reentrantes que podrían facilitar la continuidad de esta activación en el tiempo incluso después del paso de las primeras entradas sensoriales (Woolf 1991).

3.8 Los factores tróficos y su relación con las neuronas colinérgicas.

La competencia por factores tróficos como el factor de crecimiento neuronal (NGF) puede influir la distribución y los patrones de proyección de las células colinérgicas del cerebro basal anterior. Los factores tróficos son suministrados por los tejidos blanco, por ello la distribución de las neuronas que utilizan estos factores depende de ésta relación (Woolf 1991).

La plasticidad de los axones colinérgicos en el adulto está relacionada con la utilización ininterrumpida de factores tróficos, mientras que las neuronas sensoriales la detienen cuando el desarrollo termina. Los somas del cerebro basal anterior presentan el receptor al factor de crecimiento neuronal (NGF) en el adulto por lo que tiene efectos en éste grupo colinérgico. Las neuronas colinérgicas requieren estimulación eléctrica para asegurar la toma de factores tróficos (Woolf 1991).

El exceso o las deficiencias de factores tróficos pueden producir una muerte neuronal acelerada en las células colinérgicas.

3.8.1 EL NGF y la relación con el sistema colinérgico.

El NGF pertenece al grupo de los factores tróficos, mismos que pueden ser agrupados en familias. Las familias se constituyen tomando en cuenta dos criterios:

- a) Las poblaciones celulares sobre las que actúan.
- b) Estructuras similares.

Con base en esto, se han descrito cuatro familias: la del factor de crecimiento fibroblástico (FCF), la de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (FCI), la del factor de crecimiento epidérmico (FCE) y la de las neurotrofinas, llamada también familia del NGF (Escobar, 1994).

Se han propuesto dos modelos de los receptores del NGF (el de alta y el de baja afinidad). El primer modelo señala que el receptor de alta afinidad se constituye por la asociación de las subunidades p75 y TrKA. El segundo modelo propone que los sitios de unión de alta afinidad para el NGF pueden formarse en ausencia del receptor p75 y

que la sola presencia del receptor TrKA es suficiente para desencadenar respuestas biológicas (Escobar, 1994) (ver fig.4).

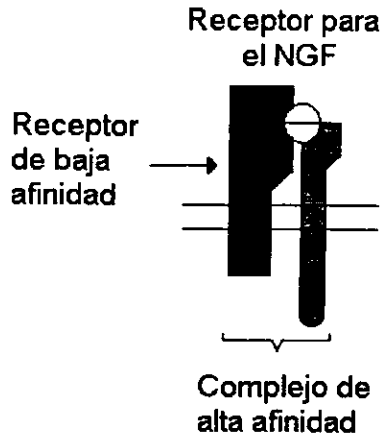


Fig.4 Estructura hipotética del receptor de alta afinidad para el NGF. Se ha propuesto que las neurotrofinas (familia de factores con actividad trófica) comparten un receptor común de baja afinidad y que sus complejos de alta afinidad se forman tras la adición de una segunda subunidad (Modificado de Escobar 1994).

El NGF era considerado como un factor que sólo tenía efectos en ciertas neuronas del sistema nervioso periférico. Posteriormente se encontró que el NGF podría jugar un papel importante en el sistema nervioso central y en particular en el sistema colinérgico. Las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior que proyectan hacia la corteza pueden responder a la administración exógena de NGF y posiblemente depender del NGF endógeno como uno de sus factores neurotróficos.

Existe evidencia a favor de la relación de NGF y los núcleos colinérgicos del cerebro basal anterior (Gutiérrez, 1996):

- i) El RNA mensajero y la proteína se encuentran en la corteza e hipocampo, sitios innervados por el núcleo colinérgico basal.
- ii) El NGF marcado radioactivamente e inyectado en corteza se transporta retrógradamente hacia las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior.
- iii) Éstas neuronas colinérgicas expresan los receptores de alta y baja afinidad para el NGF: TrKA y p75 respectivamente (Vázquez y Ebendal, 1991).

En estudios de recuperación de funciones asociativas corticales mediante trasplantes fetales se encontró que el NGF asociado con implantes de la Corteza Insular (IC) induce la recuperación del aprendizaje, observándose así la relación entre el aprendizaje y el restablecimiento de la actividad de la ChAT (Bermúdez-Rattoni y Escobar 1994). En éste sentido se mostró que:

- a) la aplicación del NGF con implantes de Corteza Insular (CI) acelera la recuperación en la habilidad para adquirir el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS).
- b) los efectos conductuales están relacionados con la integración y madurez del tejido implantado.
- c) La combinación del NGF con implantes de corteza insular y no con occipital, producen una recuperación en la habilidad para adquirir el CAS a los 15 días después del trasplante.

Utilizando el modelo en el cual el sistema colinérgico está involucrado en las funciones cognitivas, se demostró que la administración exógena del NGF puede potenciar y acelerar el crecimiento, la incursión de axones colinérgicos en el área lesionada y estimular la recuperación de funciones colinérgicas. (Bermúdez-Rattoni y Escobar 1992).

Los trabajos dedicados a estudiar la relación del NGF con el sistema colinérgico tratan sobre la administración de NGF exógeno en modelos de lesión o disfunción colinérgica. Por ello se planteó posteriormente la idea del papel del NGF en condiciones normales y se encontró que la transmisión colinérgica cortical depende activamente de la presencia del Factor de Crecimiento Neuronal (Gutiérrez 1996). Posteriormente, en el punto 5, veremos la relación útil entre el receptor de baja afinidad p75 y la vía colinérgica que nos atrae: NBM- Corteza.

3.9 El sistema colinérgico como posible integrador de las funciones cognitivas.

Esta idea está basada en la arquitectura anatómica del sistema colinérgico. Una característica importante del sistema colinérgico es la conexión recíproca. Esto permite a los subsistemas colinérgicos mantener los patrones de actividad en el tiempo, aún después de que las entradas sensoriales hayan pasado (Woolf 1991). La consolidación de la memoria, aparentemente involucra la activación prolongada de los circuitos cerebrales.

La máxima potenciación de la corteza cerebral se lleva a cabo cuando el cerebro basal anterior y las aferentes sensoriales son coestimuladas simultáneamente (Woolf 1991). Las razones, anteriores son las que nos llevan a pensar que los sistemas colinérgicos participan en la potenciación de la actividad neural: un fenómeno de importancia relevante para el proceso de la memoria (Woolf 1991).

Una característica interesante es el hecho de que las células colinérgicas del cerebro basal anterior estén conectadas con casi todas las regiones del cerebro (Woolf 1991). Esto nos lleva a pensar que podría jugar el papel de un sistema integrador de estímulos provenientes de múltiples regiones. El traducir esto en términos de comportamiento podría resultar importante.

4. Trabajos de lesiones en el Núcleo Basal Magnocelular.

El enfoque de estos trabajos en general es la evaluación de los efectos cognitivos utilizando diferentes tipos de lesiones. Estas lesiones al no ser selectivas generan discrepancias en las interpretaciones conductuales (Dunnett et al 1991). En resumen se ha trabajado principalmente con tres tipos de lesiones (Everitt y Robbins 1997):

- i) Lesiones electrolíticas. Son muy difíciles de interpretar debido a que no tienen selectividad en el daño de fibras ni en el de cuerpos neuronales.
- ii) Lesiones excitotóxicas. Existe duda acerca del grado en el cual se extienden afectando axones. Pueden desmielinizar axones quizás temporalmente, pero si esto contribuye a déficits funcionales, no ha sido determinado. Las excitotoxinas como el ácido iboténico (afecta neuronas que portan receptores a NMDA) destruyen neuronas no colinérgicas palidales y otras en la sustancia innominata. La utilización de estas toxinas en estudios contemporáneos de la función colinérgica del cerebro basal anterior ha llevado a interpretaciones de los efectos de las lesiones colinérgicas desde pérdidas menores, hasta una devastante destrucción del pallidum dorsal y ventral y en la sustancia innominata
- iii) Lesiones con ácido quisquálico. Afecta preferencialmente neuronas que tienen receptores a AMPA y kainato, excluyendo a las que portan el receptor a NMDA. El ácido quisquálico destruye con una mayor eficacia comparado con el iboténico neuronas del nbm.

La máxima potenciación de la corteza cerebral se lleva a cabo cuando el cerebro basal anterior y las aferentes sensoriales son coestimuladas simultáneamente (Woolf 1991). Las razones, anteriores son las que nos llevan a pensar que los sistemas colinérgicos participan en la potenciación de la actividad neural: un fenómeno de importancia relevante para el proceso de la memoria (Woolf 1991).

Una característica interesante es el hecho de que las células colinérgicas del cerebro basal anterior estén conectadas con casi todas las regiones del cerebro (Woolf 1991). Esto nos lleva a pensar que podría jugar el papel de un sistema integrador de estímulos provenientes de múltiples regiones. El traducir esto en términos de comportamiento podría resultar importante.

4. Trabajos de lesiones en el Núcleo Basal Magnocelular.

El enfoque de estos trabajos en general es la evaluación de los efectos cognitivos utilizando diferentes tipos de lesiones. Estas lesiones al no ser selectivas generan discrepancias en las interpretaciones conductuales (Dunnett et al 1991). En resumen se ha trabajado principalmente con tres tipos de lesiones (Everitt y Robbins 1997):

- i) Lesiones electrolíticas. Son muy difíciles de interpretar debido a que no tienen selectividad en el daño de fibras ni en el de cuerpos neuronales.
- ii) Lesiones excitotóxicas. Existe duda acerca del grado en el cual se extienden afectando axones. Pueden desmielinizar axones quizás temporalmente, pero si esto contribuye a déficits funcionales, no ha sido determinado. Las excitotoxinas como el ácido iboténico (afecta neuronas que portan receptores a NMDA) destruyen neuronas no colinérgicas palidales y otras en la sustancia innominata. La utilización de estas toxinas en estudios contemporáneos de la función colinérgica del cerebro basal anterior ha llevado a interpretaciones de los efectos de las lesiones colinérgicas desde pérdidas menores, hasta una devastante destrucción del pallidum dorsal y ventral y en la sustancia innominata
- iii) Lesiones con ácido quisquálico. Afecta preferencialmente neuronas que tienen receptores a AMPA y kainato, excluyendo a las que portan el receptor a NMDA. El ácido quisquálico destruye con una mayor eficacia comparado con el iboténico neuronas del nbm.

Los experimentos que se hicieron en los 80s con lesiones excitotóxicas en el NBM utilizando ibotenato y otros agonistas del receptor de NMDA confirmaron la creencia de que éste sistema que proyecta a la corteza favorece aspectos de aprendizaje y memoria (Everitt y Robbins 1997). Casi todo tipo de tareas de aprendizaje, son profundamente alteradas después de éstas lesiones.

Posteriormente en la búsqueda de métodos selectivos para lesionar el NBM, se demostró que ante la pérdida colinérgica neuronal de marcadores corticales, primero con ácido quisquálico y después con AMPA, la mayoría de los déficits vistos después de lesionar con agonistas de NMDA no fueron aparentes (Muir et al 1993). Posteriormente otros más confirmaron estos hallazgos (Markowska et al 1990) y comenzaron a compartir la opinión de que la temprana interpretación de estudios con lesiones, en términos de apoyar la hipótesis de que las neuronas colinérgicas del NBM favorecen el aprendizaje y la memoria está infundada.

La introducción de la inmunotoxina 192 IgG-saporina como una herramienta selectiva para lesionar el NBM, ha confirmado que la disminución colinérgica neocortical no altera muchas formas de aprendizaje (Baxter et al 1995, Torres et al 1994, Wenk et al 1994, Berger-Sweeney et al 1994.). Una tarea que es destruida por lesiones en el NBM con NMDA y es sensible a lesiones producidas por AMPA es el aprendizaje y retención de la prevención pasiva. Se ha argumentado que esto se debe a la denervación de la amígdala, una estructura importante para este condicionamiento aversivo. Las lesiones en el NBM con 192 IgG-saporina no denervan la amígdala y tampoco destruyen la prevención pasiva (Wenk et al 1994). Las lesiones producidas por la inmunotoxina saporina aplicada intraventricularmente mostraron que las tres áreas terminales del núcleo colinérgico del cerebro basal anterior presentan una disminución significativa en la actividad de la ChAT. En la inmunohistoquímica para ChAT en el núcleo de la banda diagonal de Broca y en el NBM se observó la ausencia de neuronas que tiñen para ChAT. En la medición de la actividad de la ChAT se observó una reducción significativa en la corteza, bulbos olfatorios e hipocampo (Book, et al 1992).

Existen estudios posteriores en los que se buscó evaluar la efectividad de la inmunotoxina (Torres et al 1994). Para ello se hicieron lesiones selectivas en el NBM, con el fin de establecer la dosis efectiva para las lesiones intraparenquimales. Después de estos estudios piloto se realizaron inyecciones en el Septum, Banda Diagonal de Broca y NBM. Las lesiones produjeron una pérdida extensiva y selectiva en áreas discretas del cerebro basal anterior. Éstas fueron identificadas por la pérdida de

marcadores como la acetilcolinesterasa, p75 y por la ausencia de actividad de la ChAT en las áreas blanco asociadas con cada sitio de inyección: hipocampo, corteza cingulada y neocorteza dorsolateral. La selectividad de la lesión se comprueba por la existencia de células de tamaño mediano a pequeño en el sitio de inyección de la toxina, incluyendo las células inmunoreactivas a la glutamato descarboxilasa, que forman parte de la proyección septohipocampal (Torres et al 1994).

Las lesiones denervaron la neocorteza y el hipocampo. A pesar de esta denervación, no se encontraron déficits en el laberinto de agua de Morris en ninguno de los sitios de lesión de las células del cerebro basal anterior. En contraste, se encontraron déficits pequeños pero significativos en las pruebas de prevención pasiva (lesión en el NBM) y en la prueba no igualación a la muestra DNMP (lesiones en el Septum) (Torres et al 1994).

Los resultados indican que la inmunotoxina 192-IgG-saporina es una herramienta selectiva para realizar lesiones selectivas en las neuronas del cerebro basal anterior, lo que garantiza investigaciones posteriores en relación con los efectos conductuales de la toxina (Torres et al 1994).

Además de los estudios anteriores con roedores se tienen también estudios de lesiones en el nbm con primates no humanos, los que constituyen un acercamiento más al difícil problema de las funciones de ésta estructura. Las ventajas de ésta estrategia son las siguientes:

- i) El NBM de los primates está más separado espacialmente del pallidum dorsal, por lo que es más fácil lesionar sin dañarlo.
- ii) Las comparaciones de los déficits cognitivos son más plausibles entre seres humanos y monos que con roedores, especialmente por que pueden ser utilizados paradigmas similares (Everitt y Robbins 1997).

La idea central que se obtiene a partir de los estudios con primates no humanos es que el daño substancial en el cerebro basal anterior colinérgico en monos no produce déficits importantes en aprendizaje y memoria (Everitt y Robbins 1997), éste es un resultado acorde con los experimentos con roedores, en donde al utilizar la inmunotoxina 192-IgG-saporina se dedujo que la disminución colinérgica no altera muchas formas de aprendizaje.

Hasta este punto se observa que el estudio del sistema colinérgico del cerebro basal anterior antes de la introducción de la inmunotoxina, ha tenido problemas de interpretación debido a la ausencia de una herramienta selectiva de lesión y que las

técnicas de lesión no han sido selectivas para las lesiones colinérgicas y en consecuencia los déficits conductuales pueden deberse al daño en otros sistemas neurales vecinos.

5. La inmunotoxina 192 IgG-saporina

Sin la utilización de una neurotoxina colinérgica selectiva, la utilidad del acercamiento de la lesión puede ser cuestionada seriamente.

Para tener un panorama global se mencionarán los avances metodológicos que se han realizado hasta ahora sobre los fármacos utilizados para estudiar los procesos cognitivos.

Los efectos cognitivos de los fármacos que tienen potencial terapéutico aún se exploran después de la administración sistémica. Esta aproximación psicofarmacológica no ha permitido encontrar los sitios en los cuáles los fármacos ejercen su efecto. Los procesos psicológicos que son afectados cuando la transmisión colinérgica es afectada en este sentido no es claro y tampoco lo son los mecanismos por los cuales estos procesos pueden ser influidos dentro de éstas discretas áreas corticales y subcorticales del cerebro. No fue, sino hasta principios de los años 80s en donde los anticuerpos para la ChAT se desarrollaron, permitiendo por vez primera precisar la descripción de la organización de las neuronas colinérgicas en el cerebro y la experimentación directa de las neuronas centrales colinérgicas. El uso cuidadoso de marcadores anterógrados y retrógrados después de lesiones mostró el sitio de origen y las proyecciones de las neuronas colinérgicas en el cerebro (Everitt y Robbins 1997). A partir de estos estudios han surgido algunos principios sobre la organización anatómica y funcional del sistema colinérgico.

Un problema metodológico importante sigue preocupando en la realización de muchos estudios sobre los efectos conductuales y cognitivos de las manipulaciones de los sistemas dopaminérgicos, noradrenérgico y serotoninérgico (ver esquemas de éstos sistemas en la Fig. 5) pero ya no lo es para los sistemas colinérgicos ya que ahora existe una neurotoxina que daña específicamente las neuronas colinérgicas y es utilizada para estudios funcionales. Esto ha limitado enormemente la interpretación de los resultados de muchos experimentos, en particular aquellos que involucran lesiones del NBM (Everitt y Robbins 1997). Esta razón es sencilla: las neuronas colinérgicas del NBM están entremezcladas con otras neuronas en el cerebro basal anterior especialmente neuronas gabaérgicas del pallidum dorsal y ventral, llamado recientemente amígdala

técnicas de lesión no han sido selectivas para las lesiones colinérgicas y en consecuencia los déficits conductuales pueden deberse al daño en otros sistemas neurales vecinos.

5. La inmunotoxina 192 IgG-saporina

Sin la utilización de una neurotoxina colinérgica selectiva, la utilidad del acercamiento de la lesión puede ser cuestionada seriamente.

Para tener un panorama global se mencionarán los avances metodológicos que se han realizado hasta ahora sobre los fármacos utilizados para estudiar los procesos cognitivos.

Los efectos cognitivos de los fármacos que tienen potencial terapéutico aún se exploran después de la administración sistémica. Esta aproximación psicofarmacológica no ha permitido encontrar los sitios en los cuáles los fármacos ejercen su efecto. Los procesos psicológicos que son afectados cuando la transmisión colinérgica es afectada en este sentido no es claro y tampoco lo son los mecanismos por los cuales estos procesos pueden ser influidos dentro de éstas discretas áreas corticales y subcorticales del cerebro. No fue, sino hasta principios de los años 80s en donde los anticuerpos para la ChAT se desarrollaron, permitiendo por vez primera precisar la descripción de la organización de las neuronas colinérgicas en el cerebro y la experimentación directa de las neuronas centrales colinérgicas. El uso cuidadoso de marcadores anterógrados y retrógrados después de lesiones mostró el sitio de origen y las proyecciones de las neuronas colinérgicas en el cerebro (Everitt y Robbins 1997). A partir de estos estudios han surgido algunos principios sobre la organización anatómica y funcional del sistema colinérgico.

Un problema metodológico importante sigue preocupando en la realización de muchos estudios sobre los efectos conductuales y cognitivos de las manipulaciones de los sistemas dopaminérgicos, noradrenérgico y serotoninérgico (ver esquemas de éstos sistemas en la Fig. 5) pero ya no lo es para los sistemas colinérgicos ya que ahora existe una neurotoxina que daña específicamente las neuronas colinérgicas y es utilizada para estudios funcionales. Esto ha limitado enormemente la interpretación de los resultados de muchos experimentos, en particular aquellos que involucran lesiones del NBM (Everitt y Robbins 1997). Esta razón es sencilla: las neuronas colinérgicas del NBM están entremezcladas con otras neuronas en el cerebro basal anterior especialmente neuronas gabaérgicas del pallidum dorsal y ventral, llamado recientemente amígdala

prolongada y neuronas magnocelulares no colinérgicas corticopetales. Excluyendo las neuronas palidales dorsales, las demás poblaciones celulares son frecuentemente agrupadas dentro de la substantia innominata (Everitt y Robbins 1997).

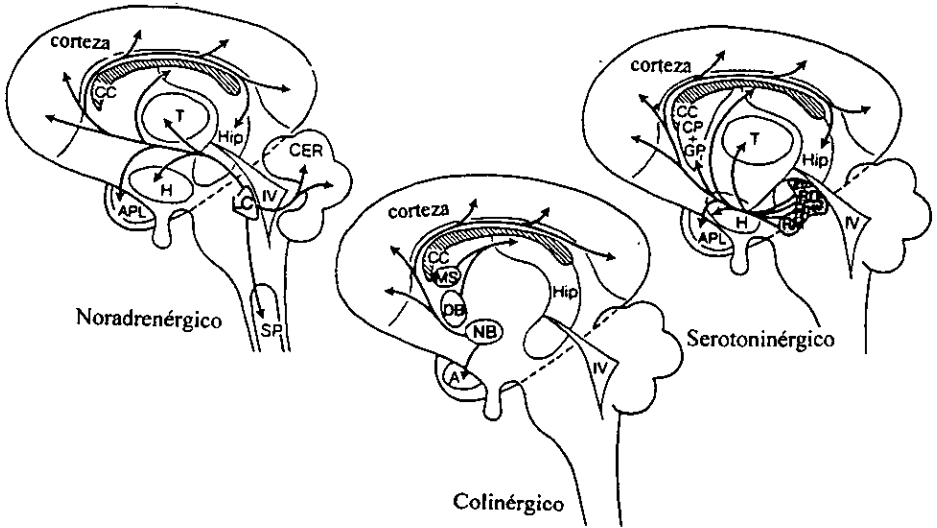
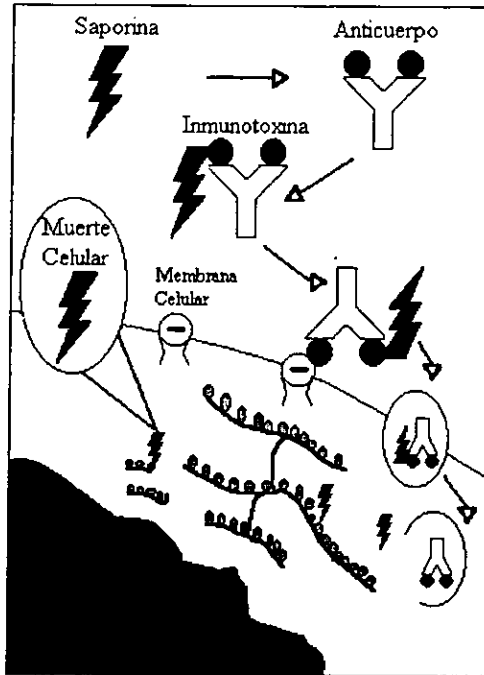


Fig. 5 Ejemplos de sistemas difusos subcortical-cortical de neurotransmisores en el humano que juegan un papel importante en aprendizaje y memoria. Abreviaturas: A, amígdala; APL, amígdala-lóbulo piriforme; CC, cuerpo caloso; CER, cerebelo; CP caudado-putamen; DB, banda diagonal de Broca; GP, globus pallidus; H, hipotálamo; HIP, hipocampo; IV, cuarto ventrículo; LC, locus coeruleus; MS, núcleo septal medial; NB núcleo basal de Meynert; RD, núcleo raphe dorsal; RM, núcleo medial raphe; SP, médula espinal; T, tálamo. (Emson y Lindvall 1986, modificado de Dudai 1990)

Recientemente, se desarrolló la inmunotoxina 192 IgG-saporina (Wiley et al 1991). La inmunotoxina se construyó a partir del 192 IgG, que es un anticuerpo monoclonal para el receptor del Factor del Crecimiento Neuronal (NGF) de baja afinidad (p75).

El anticuerpo 192 IgG está unido químicamente vía un enlace disulfuro a la proteína inactivadora de ribosomas (ver fig.6). En los experimentos de Wiley et al. 1991 se observó que inyecciones de la inmunotoxina destruye neuronas simpáticas postganglionares y algunas neuronas sensoriales. Sus resultados muestran que las

inmunotoxinas antineuronales son una acercamiento, que puede ser muy útil en una amplia variedad de aplicaciones neurobiológicas (Wiley et al 1991).



La Saporina destruye la síntesis de proteínas y la viabilidad celular.

Fig.6 Esquema de los componentes de la inmunotoxina 192 IgG-saporina y su mecanismo de acción.

La toxina se utiliza actualmente en un número de creciente de estudios de efectos cognitivos de lesiones de neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior (Everitt y Robbins 1997). Estas neuronas tienen en gran cantidad el receptor de baja afinidad p75 para el factor de crecimiento neuronal. La inmunotoxina se desarrolló especialmente para estas neuronas. En este sentido, 192 IgG-saporina es una herramienta para lesionar selectivamente. El anticuerpo que tiene unida la toxina saporina se combina con el receptor p75 y es internalizada dentro de las neuronas colinérgicas que lo presentan permitiendo a la citotoxina destruir las neuronas. Ésta es la relación útil entre el receptor de baja afinidad p75 y la vía colinérgica que nos atrae: NBM- Corteza.

La idea de lesionar selectivamente y experimentar con tareas que sean sensibles a las lesiones de sitios colinérgicos como el septum medial, la banda vertical de Broca y el NBM, representa un camino efectivo para disectar los procesos psicológicos que son

interrumpidos después de la denervación colinérgica resultando en impedimentos de aprendizaje, memoria y atención (Everitt y Robbins 1997).

6. El problema de investigación

Dada la discrepancia entre las consecuencias conductuales de lesionar el NBM este trabajo está dedicado a responder si la denervación de las fibras colinérgicas que portan el receptor p75 es importante para el aprendizaje del Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS).

La tarea seleccionada fue el CAS. La selección de la tarea corresponde a la evidencia generada con relación a los siguientes factores:

- a) La Corteza Insular (CI) es el único sitio cortical directamente involucrado en la adquisición y retención del CAS (Aggleton et al 1981, Braun et al 1982, Kiefer 1985, Kiefer y Brown 1979, Yamamoto et al 1980).
- b) Las lesiones excitotóxicas en el NBM impiden el aprendizaje del CAS. Esto involucra la vía colinérgica NBM-corteza en el aprendizaje de este paradigma (Lopez-García et al. 1993, Naor, C. y Dudai, Y. 1996).

Esta investigación comprendió 4 niveles de estudio: bioquímico, histológico, de conectividad y conductual para:

- a) Determinar la posible disminución en la actividad colinérgica de la Corteza Insular (CI) bajo el efecto de la lesión selectiva en el NBM con la inmunotoxina 192 IgG-saporina.
- b) Mostrar el daño del tejido colinérgico que pudiera resultar de la lesión con la inmunotoxina.
- c) Evaluar la posible denervación colinérgica ascendente NBM-CI bajo el efecto de la lesión.
- d) Determinar la probable importancia de la denervación de las fibras colinérgicas que portan el receptor p75 para el aprendizaje del CAS.

7. Procedimientos experimentales.

7.1 Sujetos.

Todos los animales empleados en el presente estudio fueron ratas macho de la cepa Wistar, con pesos entre 250 y 300g. Que fueron mantenidas en el bioterio en cajas

interrumpidos después de la denervación colinérgica resultando en impedimentos de aprendizaje, memoria y atención (Everitt y Robbins 1997).

6. El problema de investigación

Dada la discrepancia entre las consecuencias conductuales de lesionar el NBM este trabajo está dedicado a responder si la denervación de las fibras colinérgicas que portan el receptor p75 es importante para el aprendizaje del Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS).

La tarea seleccionada fue el CAS. La selección de la tarea corresponde a la evidencia generada con relación a los siguientes factores:

- a) La Corteza Insular (CI) es el único sitio cortical directamente involucrado en la adquisición y retención del CAS (Aggleton et al 1981, Braun et al 1982, Kiefer 1985, Kiefer y Brown 1979, Yamamoto et al 1980).
- b) Las lesiones excitotóxicas en el NBM impiden el aprendizaje del CAS. Esto involucra la vía colinérgica NBM-corteza en el aprendizaje de este paradigma (Lopez-García et al. 1993, Naor, C. y Dudai, Y. 1996).

Esta investigación comprendió 4 niveles de estudio: bioquímico, histológico, de conectividad y conductual para:

- a) Determinar la posible disminución en la actividad colinérgica de la Corteza Insular (CI) bajo el efecto de la lesión selectiva en el NBM con la inmunotoxina 192 IgG-saporina.
- b) Mostrar el daño del tejido colinérgico que pudiera resultar de la lesión con la inmunotoxina.
- c) Evaluar la posible denervación colinérgica ascendente NBM-CI bajo el efecto de la lesión.
- d) Determinar la probable importancia de la denervación de las fibras colinérgicas que portan el receptor p75 para el aprendizaje del CAS.

7. Procedimientos experimentales.

7.1 Sujetos.

Todos los animales empleados en el presente estudio fueron ratas macho de la cepa Wistar, con pesos entre 250 y 300g. Que fueron mantenidas en el bioterio en cajas

interrumpidos después de la denervación colinérgica resultando en impedimentos de aprendizaje, memoria y atención (Everitt y Robbins 1997).

6. El problema de investigación

Dada la discrepancia entre las consecuencias conductuales de lesionar el NBM este trabajo está dedicado a responder si la denervación de las fibras colinérgicas que portan el receptor p75 es importante para el aprendizaje del Condicionamiento Aversivo a los Sabores (CAS).

La tarea seleccionada fue el CAS. La selección de la tarea corresponde a la evidencia generada con relación a los siguientes factores:

- a) La Corteza Insular (CI) es el único sitio cortical directamente involucrado en la adquisición y retención del CAS (Aggleton et al 1981, Braun et al 1982, Kiefer 1985, Kiefer y Brown 1979, Yamamoto et al 1980).
- b) Las lesiones excitotóxicas en el NBM impiden el aprendizaje del CAS. Esto involucra la vía colinérgica NBM-corteza en el aprendizaje de este paradigma (Lopez-García et al. 1993, Naor, C. y Dudai, Y. 1996).

Esta investigación comprendió 4 niveles de estudio: bioquímico, histológico, de conectividad y conductual para:

- a) Determinar la posible disminución en la actividad colinérgica de la Corteza Insular (CI) bajo el efecto de la lesión selectiva en el NBM con la inmunotoxina 192 IgG-saporina.
- b) Mostrar el daño del tejido colinérgico que pudiera resultar de la lesión con la inmunotoxina.
- c) Evaluar la posible denervación colinérgica ascendente NBM-CI bajo el efecto de la lesión.
- d) Determinar la probable importancia de la denervación de las fibras colinérgicas que portan el receptor p75 para el aprendizaje del CAS.

7. Procedimientos experimentales.

7.1 Sujetos.

Todos los animales empleados en el presente estudio fueron ratas macho de la cepa Wistar, con pesos entre 250 y 300g. Que fueron mantenidas en el bioterio en cajas

individuales a 25 °C con agua y alimento *ad libitum*, en un ciclo de luz-obscuridad 12:12h.

7.2 Análisis bioquímico: microdiálisis

La implantación de la sonda de microdiálisis se llevó a cabo en la Corteza Insular donde se hizo el un muestreo de la acetilcolina. La identificación y cuantificación de la acetilcolina presente en las muestras se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección electroquímica.

En la detección electroquímica la acetilcolina presente en la muestra se descompone en colina y acetato debido a la acetil-colinesterasa (AChE) presente en el reactor enzimático acoplado al cromatógrafo. Una segunda enzima, la colín-oxidasa descompone la colina en betaina y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es oxidante, por lo que al pasar frente a un electrodo se establece un potencial positivo que origina una corriente de electrones cuya intensidad (medida en miliamperios) es proporcional a la cantidad de peróxido generado.

El peróxido generado es proporcional a la cantidad de acetilcolina presente en las muestras obtenidas por microdiálisis, por lo que se puede estimar cuantitativamente la acetilcolina.

Tres grupos fueron utilizados para el experimento de microdiálisis. Los animales recibieron inyecciones unilaterales en el NBM, de la inmunotoxina (Sap. n=5) y de vehículo (Veh n=5). El grupo Ctr. n=4 constituyó el control intacto (ver protocolo de la fig.7). Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico 65mg/Kg de peso.

Mediante técnicas estereotáxicas se practicaron trépanos en las siguientes coordenadas, correspondientes al NBM: anteroposterior = -0.8 mm, lateral = \pm 2.5 dorsoventral = -8.0, con respecto a bregma. Para las inyecciones (en el lado derecho, grupo Sap.) se utilizó la toxina 192 IgG-saporina disponible comercialmente (Chemicon, Tamecula. Ca.), en un volumen de 0.8 μ l, a una concentración de 0.2 μ g/ μ l. En las inyecciones en el hemisferio contralateral (grupo Veh.) se utilizó un volumen de 0.8 μ l de PBS (vehículo). Las inyecciones en ambos hemisferios se realizaron con una bomba con un flujo constante de 0.07 μ l./min. El grupo Ctr. no recibió inyecciones.

Después de las inyecciones, se implantaron bilateralmente las guías cánula (ó guías intracerebrales) para la sonda de microdiálisis en la Corteza Insular (CI) en los tres grupos. Las coordenadas estereotáxicas fueron las siguientes: anteroposterior = +0.2

mm. lateral = ± 0.5 y dorsoventral = -4.0 mm con respecto a bregma. Las cánulas se fijaron al cráneo con cemento dental y con tres tornillos de acero inoxidable en el cráneo.

Doce días después (o el tiempo necesario para la recuperación de los animales) se llevó a cabo el experimento de microdiálisis *in vivo*.

El experimento de microdiálisis consiste en la inserción de la sonda de microdiálisis (BAS CMA12, 0.5 mm. de diámetro y 3 mm. de longitud). La sonda fue continuamente perfundida con solución ringer, suplementada con bromuro de neostigmina (5mM.) con un flujo de 2 ml. /min. mediante una bomba de microinfusión. Los primeros 60 minutos de muestra se descartaron, y a partir de ahí las muestras o fracciones, fueron colectadas cada 15 minutos (30 μ l. por muestra). En la tercera muestra se añadió KCL (56mM) al medio de perfusión, mientras que la concentración de NaCl se disminuyó a 82mM para mantener la osmolaridad fisiológica. En total, se coléctaron 6 muestras las cuales fueron congeladas a -70 °C para analizarlas posteriormente.

Las fracciones de microdiálisis que corresponden al hemisferio lesionado con la toxina 192 IGg-saporina (lado derecho) forman el grupo Sap. y las fracciones que corresponden al hemisferio contralateral tratado con vehículo forman el grupo Veh. Las fracciones del grupo Ctr. corresponden al control intacto.

Para el análisis de los niveles de acetilcolina (ACh) se utilizó una columna SepTiks de microboro (BAS acetilcholine-choline assay kit). Colina y acetilcolina fueron transformados en peróxido y betaína mediante un reactor enzimático acoplado a la columna de separación (BAS). El peróxido de hidrógeno se detectó electroquímicamente mediante un electrodo de platino (Ag/AgCl) a 500 mV. El límite de detección se definió como la cantidad de acetilcolina suficiente para producir un pico fuera del doble del ruido basal, es decir, de aproximadamente 0.2 pMol.

Protocolo del análisis de la liberación extracelular de acetilcolina *in vivo* mediante microdiálisis.

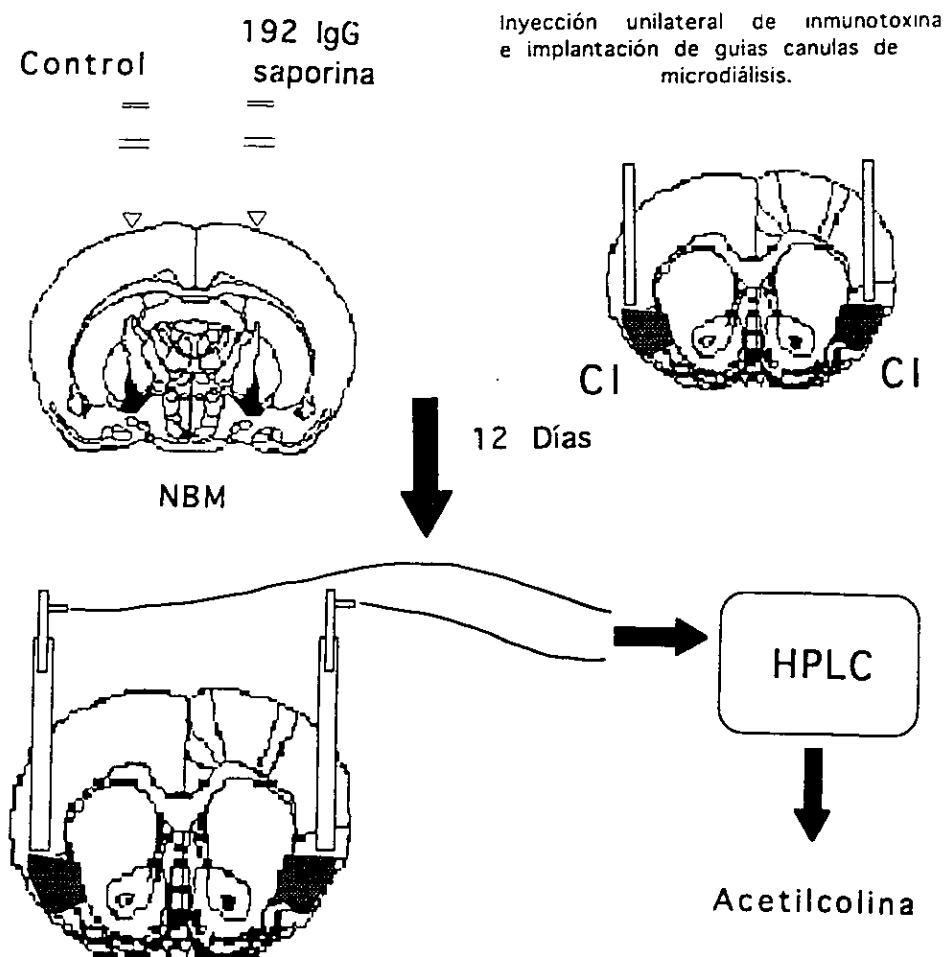


Fig.7 Un grupo de cinco animales fue inyectado unilateralmente (lado derecho) con la toxina 192 IgG-saporina en el NBM. En el hemisferio contralateral (lado izquierdo) los animales fueron inyectados con vehículo. Este mismo grupo fue implantado, con guías cánula para la sonda de microdiálisis, dirigidas hacia la corteza insular (CI). Un grupo de dos animales fue utilizado como control intacto, ya que no recibió inyecciones en el NBM y sólo fue implantado con guías cánula para la sonda de microdiálisis en la corteza insular.

7.3 Análisis histológico.

En este análisis interesa observar:

- 1) El estado del tejido colinérgico en el NBM y la Corteza Insular, mediante la técnica para acetilcolinesterasa.
- 2) Observar el estado de células individuales del NBM, en este caso utilizamos la técnica para DFP, que es un inhibidor irreversible de la acetilcolinesterasa.

7.3.1 Técnica de acetilcolinesterasa.

Esta técnica histológica nos permite localizar tejidos colinérgicos. En este caso el NBM y en la Corteza Insular. La marca de un tejido intacto estará dada, al observar el tejido teñido de un color café.

Un grupo de 3 ratas fué lesionado unilateralmente con la inmunotoxina 192 IgG-saporina en el NBM (en un volumen de $0.8\mu\text{l}$, a una concentración de $0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$.) Para las inyecciones en el hemisferio contralateral se utilizó un volumen de $0.8\mu\text{l}$ de PBS (vehículo). Para llevar a cabo las inyecciones se practicaron trépanos en las coordenadas correspondientes al NBM. Diez días después, los animales fueron perfundidos. A través de la aorta ascendente los animales recibieron solución salina al 0.15M (para lavar el tejido) y después el paraformaldehído al 4%. Una vez fijados, se obtuvieron los cerebros y se depositaron en una solución de sacarosa al 30% para facilitar los cortes. Las secciones coronales de $40\mu\text{m}$ se obtuvieron en el intervalo de la región basal del cerebro anterior. Los cortes fueron montados en laminillas para después ser procesados con la técnica de acetilcolinesterasa. En esta técnica se utilizan dos soluciones, la solución incubadora y la solución reveladora. Para preparar la solución incubadora se pesan 6.8g de acetato de sodio, 1.0g de sulfato cúprico y 1.2g de glicina, se afora a 1L con agua bidestilada y se ajusta a pH 5 con ácido clorhídrico diluido. Se toman 100ml de esta solución y se le agregan 116 mg de acetiltiocolina yodada y 3mg de etopropazina. El tejido se incubó en esta solución durante toda la noche.

La solución reveladora consiste en una solución al 1% de sulfuro de sodio. A la mañana siguiente se cambió la solución incubadora por la solución al 1% de sulfuro de sodio.

Se reveló durante 10 min. aproximadamente (el tiempo necesario para obtener una coloración café oscura en el tejido).

7.3.2 Técnica de DFP

Esta técnica es un refinamiento de la anterior, ya que en lugar de observar el panorama general del estado del tejido colinérgico nos permite ver células individuales.

Para realizarla, se formó un grupo de 3 ratas. Los animales fueron lesionados unilateralmente con la inmunotoxina 192 IgG-saporina en el NBM (con un volumen de $0.8\mu\text{l}$, a una concentración de $0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Para las inyecciones en el hemisferio contralateral se utilizó un volumen de $0.8\mu\text{l}$ de PBS (vehículo). Diez días después, los animales fueron inyectados intramuscularmente con di-isopropilfosfofluoridato DFP (Sigma), con una dosis de 1.8 mg/kg , disuelto en aceite de almendras y perfundidos dos horas después. A través de la aorta ascendente los animales recibieron solución salina al 0.15M (para lavar el tejido) y después el paraformaldehído al 4% . Una vez fijados, se obtuvieron los cerebros y se depositaron en una solución de sacarosa al 30% para facilitar los cortes. Las secciones coronales de $40\mu\text{m}$ se obtuvieron en el intervalo de la región basal del cerebro anterior. Los cortes fueron montados en laminillas para después ser procesados con la técnica de acetilcolinesterasa, que mencionamos en el punto anterior.

7.4 Estudio de conectividad.

Con este estudio se determinó el efecto de la inmunotoxina en las fibras aferentes del cerebro basal anterior hacia la corteza. Para cuantificar el posible daño determinaremos la densidad relativa de las neuronas en el NBM y en el tálamo ventromedial como estructura control.

Para realizar este experimento, se formaron dos grupos, el grupo c = 6 y el grupo d = 2. El grupo c recibió inyecciones unilaterales de la inmunotoxina 192 IgG-saporina en el NBM. En el hemisferio contralateral se inyectó un volumen de $0.8\mu\text{l}$ de PBS (vehículo). Quince días después, los animales recibieron una inyección bilateral en la CI de un trazador retrógrado fluorescente. El trazador retrógrado fluorogold ($0.3\mu\text{l}$ al 2.5%) fue aplicado bilateralmente en la corteza insular mediante una bomba de microinfusión ($0.07\mu\text{l}/\text{min}$). El grupo d es nuestro grupo control ya que sólo recibió inyecciones bilaterales del trazador retrógrado fluorescente en la corteza insular (véase el protocolo experimental de la fig. 8).

Protocolo experimental del estudio de conectividad.

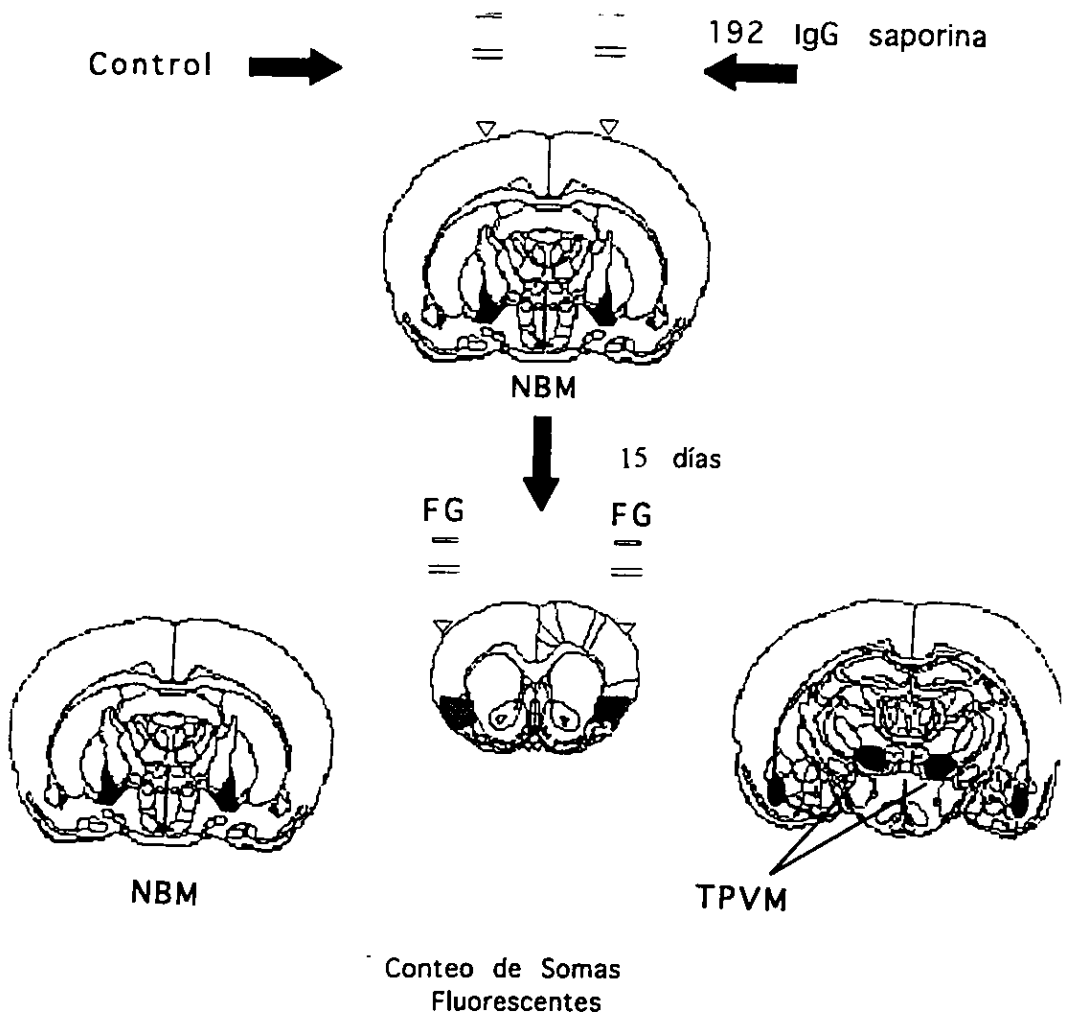


Fig. 8 Esquema del proceso experimental para el estudio de conectividad. FG, fluorogold; NBM, Núcleo Basal Magnocelular.

Tres días después los animales fueron perfundidos con paraformaldehído al 4% a través de la aorta ascendente (previo al paraformaldehído los animales recibieron una solución salina 0.15M, para lavar el tejido). Los cerebros obtenidos se depositaron en una solución de sacarosa al 30 % para facilitar los cortes histológicos. Las secciones

coronales obtenidas fueron de 40 μm en el intervalo de la región basal del cerebro anterior y el tálamo ventromedial como estructura vecina control. La presencia de fluorogold en las neuronas marcadas retrógradamente se estudió mediante un microscopio de fluorescencia. Para la determinación de la densidad relativa de neuronas marcadas se realizó lo siguiente: se tomaron 12 secciones coronales para cada estructura (para el NBM y para el tálamo ventromedial) y por cada cerebro, se contaron las células marcadas en un área de 0.35mm^2 para la región basal (NBM) y un área de 0.1mm^2 para el tálamo ventromedial en cada hemisferio cerebral. Se realizaron cuatro muestreos en las áreas de mayor densidad y se promediaron. Finalmente se obtuvo el promedio general de todas las secciones para cada hemisferio y para cada cerebro.

7.5. Estudio conductual.

Para llevar a cabo el experimento se formaron tres grupos de animales, el experimental (IgG Sap.) $n=8$, el tratado con vehículo (Veh.) $n=8$, y el control intacto (Cont.) $n=8$. El grupo experimental fue lesionado bilateralmente en el NBM con la inmunotoxina 192-IgG saporina.

Protocolo experimental del CAS:

Para esta prueba se priva a los animales de agua, dándoles solamente a una cierta hora del día durante 15 minutos, de manera que logremos que cada animal beba de una manera regular (utilizando los días necesarios para que esto suceda). A esto se le llama establecer una línea base (en nuestro caso la línea base se estableció en 6 días). Una vez establecida llega el día del entrenamiento en el cual se da a beber a los animales en lugar de agua, una solución dulce de sacarina al 0.1 %, como estímulo novedoso durante 15 minutos. Los animales beberán dada la privación en que se encuentran. Después de 30 minutos los animales reciben una inyección intraperitoneal de cloruro de litio (1.68g de LiCl en 100 ml de agua desionizada en una dosis de 7.5 ml por Kg. de peso), lo que les produce un intenso malestar gástrico. Para probar el aprendizaje de esta aversión, se vuelve a privar a los animales de agua, estableciendo nuevamente la línea base (en nuestro caso la línea se restableció a los 6 días). El día siguiente se convierte en el día de la prueba, en donde sustituiremos el agua por la solución de sacarina como lo hicimos anteriormente. Podremos distinguir la aversión al observar una clara disminución en el consumo, a pesar de la privación en que se encuentran los animales.

8. Resultados

8.1 Resultado del análisis de microdiálisis.

La fig. 9 nos muestra los resultados de los grupos 1.Sap. 2.Veh. y 3.Ctr. La gráfica presenta la concentración de acetilcolina con respecto al número de fracción analizada.

En la gráfica podemos ver una pérdida significativa (** $p < 0.01$ vs. control. ANOVA con post hoc de Fisher) de los niveles fisiológicos basales de acetilcolina ante la estimulación por KCL, únicamente en el hemisferio que recibió el tratamiento con la inmunotoxina 192 IGg-saporina. Esto no ocurre en los hemisferios que no recibieron tratamiento alguno (Ctr.) y en los tratados con vehículo (Veh.). En estos últimos la actividad colinérgica no se altera dado que la adición de 56mM de KCL al líquido de perfusión provoca una inmediata liberación de ACh. Con esto podemos asociar la disminución colinérgica a los efectos de la inmunotoxina 192 IGg-saporina. En las fracciones 5 y 6 se observa que los niveles de acetilcolina de los grupos Veh. Y Ctr. tienden a los basales. El grupo Sap. siempre estuvo en los niveles basales. Con esto podemos inferir que el daño ocasionado por la inmunotoxina impide la liberación de niveles normales de acetilcolina ante la estimulación.

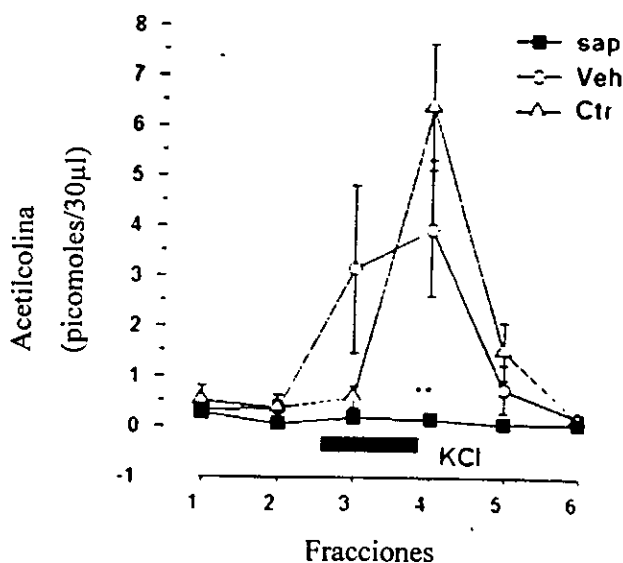


Fig. 9 Liberación extracelular de acetilcolina en el parénquima de la corteza insular. El grupo Sap y Veh. con $n=5$, y el grupo Ctr. con $n=4$. La barra indica la adición de 56mM de KCL. ** $p < 0.01$ vs. control. ANOVA con post hoc de Fisher.

8.2 Resultados del análisis histológico

8.2.1 Colinesterasa

Después de la inyección de la inmunotoxina el daño en el tejido colinérgico es claro. Este no es el caso del hemisferio contralateral tratado con vehículo ver fig. 10



Fig. 10 Daño en la corteza insular asociado con la inyección de la toxina 192 IgG saporina en el NBM. Es contrastante la ausencia de tinción del hemisferio tratado con la toxina (izquierda) comparado con el hemisferio contralateral densamente teñido (derecha).

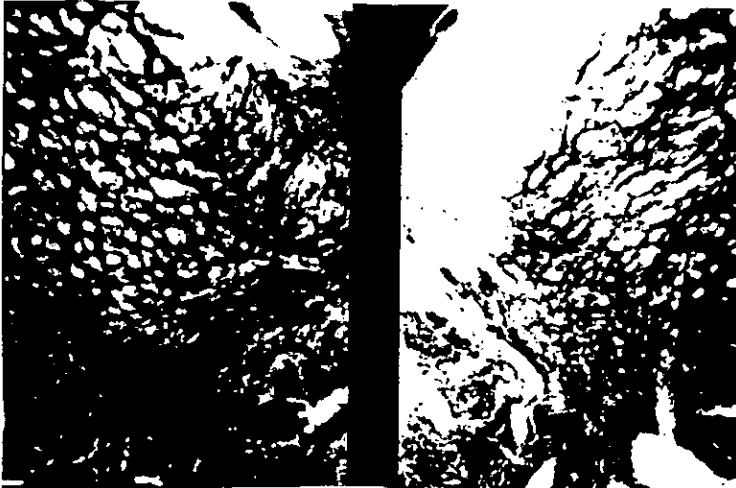


Fig. 11 Daño en el NBM asociado con la inyección de la toxina 192 IgG saporina en el NBM. Es evidente la ausencia de tinción del hemisferio tratado con la toxina (derecha) comparado con el hemisferio contralateral que está densamente teñido (izquierda).

8.2.2 DFP

La fig.12 muestra una clara pérdida de células colinérgicas en el NBM bajo el efecto de la toxina en comparación con el hemisferio tratado con vehículo (ver fig 10).

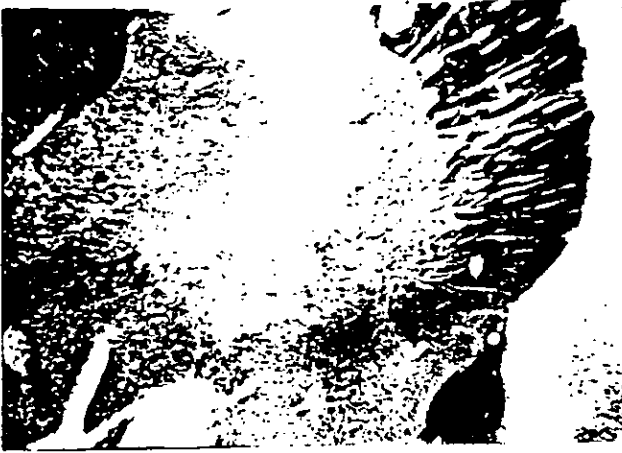


Fig. 12 Ausencia de células colinérgicas en el NBM relacionada con el daño causado por la inmunoxina 192 IgG-saporina.



Fig 13. Presencia de células colinérgicas en el NBM en el hemisferio contralateral tratado con vehículo.

8.3 Resultado del estudio de conectividad.

Los siguientes resultados muestran el marcado de células fluorescentes (fotografías tomadas con filtro negativo) en la región basal NBM y el núcleo talámico ventromedial como estructura vecina control.

El fluorogold (FG) al ser un trazador retrógrado fluorescente fué transportado de la Corteza Insular a los somas del NBM y del tálamo ventromedial en el hemisferio tratado con vehículo. En el hemisferio tratado con la inmunotoxina no se observa fluorescencia en los somas del NBM, esto quiere decir que la inmunotoxina provocó la denervación de la Corteza Insular. En el núcleo talámico si se observa fluorescencia. Lo anterior demuestra selectividad de la toxina al no dañar estructuras vecinas (ver fig.14).

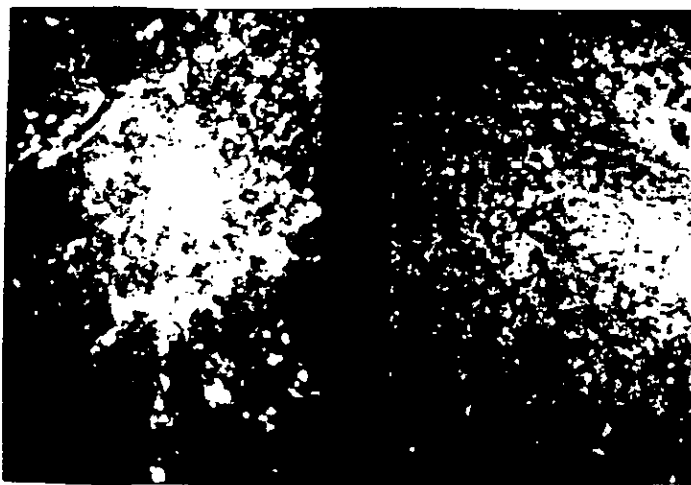


Fig. 14 Denervación de la corteza asociada al efecto de la inmunotoxina. El trazador retrógrado inyectado en la corteza insular no fue transportado a las células del NBM debido al daño producido (derecha), en contraste los animales control (izquierda).

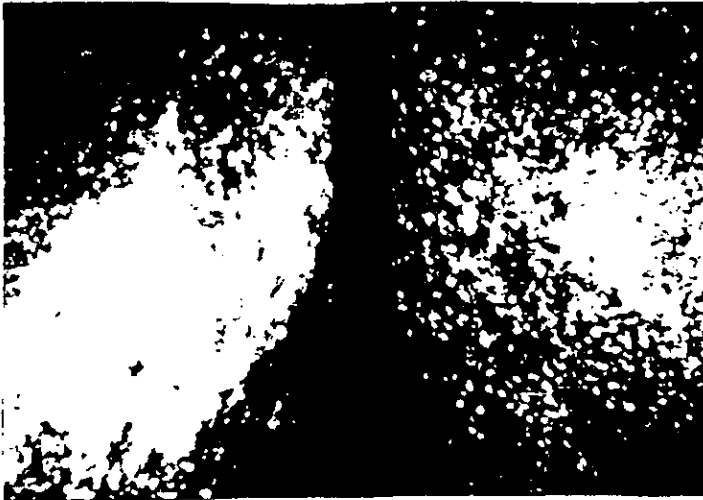


Fig.15 Ausencia del daño causado por la toxina en regiones adyacentes, en este caso el tálamo. En este caso podemos observar la selectividad de la toxina.

La siguiente gráfica muestra la densidad media de células marcadas para el NBM y para el tálamo ventromedial. La densidad celular en el NBM se redujo significativamente (** $p < 0.01$, ANOVA con post hoc de Fisher) por el efecto de la inmunotoxina en comparación con el hemisferio tratado con vehículo y con el control. La inmunotoxina deja intactas a las estructuras vecinas demostrando selectividad en la lesión.

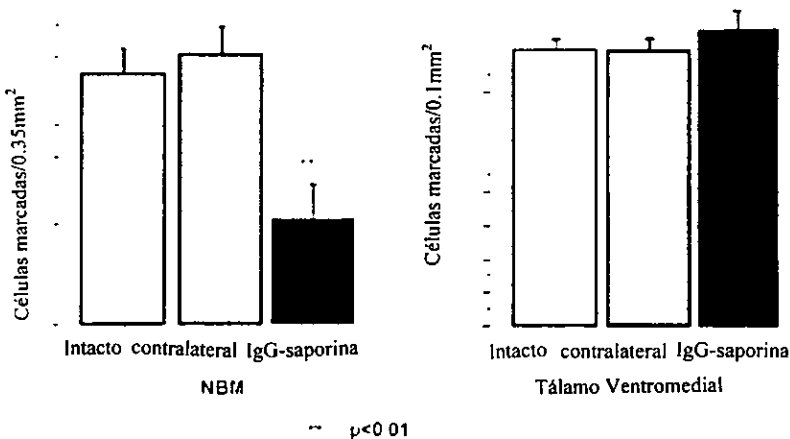


Fig.16 Número promedio de células marcadas con el trazador fluorescente en el NBM y en el tálamo ventromedial (n=6 en el grupo contralateral y de IgG saporina y n=2 en el grupo intacto) ** $p < 0.01$, ANOVA con post hoc de Fisher.

8.4 Resultado del estudio conductual.

La prueba pos hoc de Fisher muestra que las lesiones de la inmunotoxina en el NBM no impiden el aprendizaje del CAS (ver fig. 17). El consumo de sacarina de los tres grupos es semejante, esto implica que los tres grupos presentaron la aversión, indicador del aprendizaje del CAS.

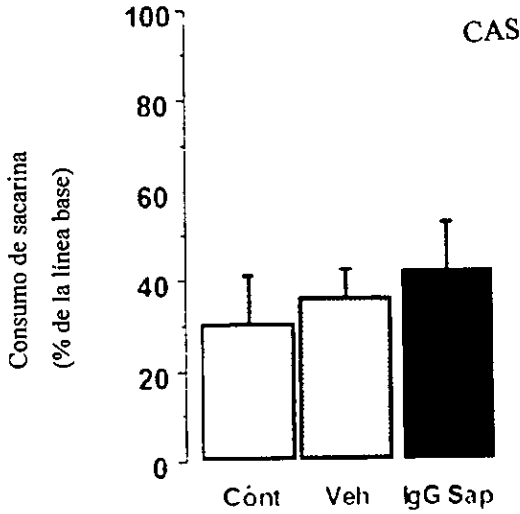


Fig.17 Ausencia de efecto significativo en el aprendizaje del CAS bajo el efecto de la toxina (ANOVA con post hoc de Fisher $n=8$ en todos los casos)

Discusión.

9. Efecto de la inmunotoxina 192 IgG-saporina

Los resultados en este estudio muestran que no hay un efecto significativo del daño de las aferencias del NBM hacia la corteza sobre el CAS. La pregunta que se deriva ahora es sobre la implicación de la actividad colinérgica sobre el CAS. Con los experimentos de este trabajo se observa una disminución de los niveles de acetilcolina dado que no hay aporte de la transmisión colinérgica por parte del NBM y sin embargo el aprendizaje del CAS no se ve afectado. Esto es contrario a la creencia anterior en la que la vía NBM-corteza estaba involucrada en procesos de aprendizaje (Everitt y Robbins 1997). Esta creencia nace a partir de la hipótesis colinérgica en la cual el sistema colinérgico del cerebro basal anterior juega un papel central en el aprendizaje y memoria y que los estados patológicos que involucran disfunción mnemónica se deben a la pérdida o disfunción de las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior (Baxter et al 1995).

8.4 Resultado del estudio conductual.

La prueba pos hoc de Fisher muestra que las lesiones de la inmunotoxina en el NBM no impiden el aprendizaje del CAS (ver fig. 17). El consumo de sacarina de los tres grupos es semejante, esto implica que los tres grupos presentaron la aversión, indicador del aprendizaje del CAS.

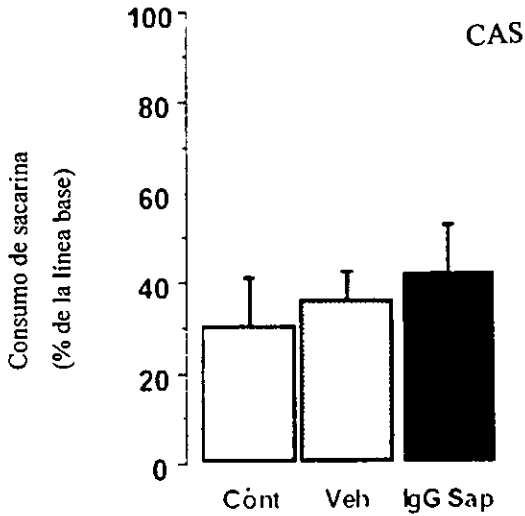


Fig.17 Ausencia de efecto significativo en el aprendizaje del CAS bajo el efecto de la toxina (ANOVA con post hoc de Fisher n=8 en todos los casos)

Discusión.

9. Efecto de la inmunotoxina 192 IgG-saporina

Los resultados en este estudio muestran que no hay un efecto significativo del daño de las aferencias del NBM hacia la corteza sobre el CAS. La pregunta que se deriva ahora es sobre la implicación de la actividad colinérgica sobre el CAS. Con los experimentos de este trabajo se observa una disminución de los niveles de acetilcolina dado que no hay aporte de la transmisión colinérgica por parte del NBM y sin embargo el aprendizaje del CAS no se ve afectado. Esto es contrario a la creencia anterior en la que la vía NBM-corteza estaba involucrada en procesos de aprendizaje (Everitt y Robbins 1997). Esta creencia nace a partir de la hipótesis colinérgica en la cual el sistema colinérgico del cerebro basal anterior juega un papel central en el aprendizaje y memoria y que los estados patológicos que involucran disfunción mnemónica se deben a la pérdida o disfunción de las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior (Baxter et al 1995).

El presente estudio contribuye a aclarar las discrepancias entre los déficits conductuales producidos por lesiones excitotóxicas en el NBM. Las principales discrepancias surgían por que las lesiones destruían neuronas no colinérgicas del NBM y de estructuras adyacentes, generando interpretaciones dudosas de los déficits cognitivos. Esta falta de selectividad dañaba procesos no cognitivos y contribuía a déficits de memoria aparentes.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con estudios previos (Torres et al 1994) en donde se ha mostrado como las inyecciones intraventriculares de la inmunotoxina ocasionan una pérdida extensiva de las células colinérgicas basales del cerebro anterior. En el nivel anatómico, se muestra una profunda denervación de la neocorteza. En el nivel conductual no producen déficits significativos. Estos resultados en conjunto ponen en duda el papel de la transmisión colinérgica en el aprendizaje de paradigmas conductuales como el CAS y el laberinto de agua de Morris.

La extensiva distribución de las neuronas colinérgicas en el cerebro, implica que la transmisión colinérgica tiene un papel importante en las funciones cerebrales. En este sentido, se piensa que el sistema colinérgico participa en un control global de las funciones cerebrales, así como en un nivel superior del procesamiento de la información (Wainer y Mesulam 1990). En este sentido se puede pensar que la liberación de acetilcolina por encima de los niveles fisiológicos basales, como producto de la estimulación, no es indispensable para el aprendizaje de ciertos paradigmas conductuales, pero puede serlo para niveles superiores del proceso de la información.

Es un progreso importante, en el sentido de delinear la arquitectura del sistema colinérgico, la introducción de la inmunotoxina como herramienta selectiva de lesión.

El sistema colinérgico es un continuo, a diferencia de lo que se tenía pensado anteriormente en donde el sistema colinérgico se concebía como núcleos discretos. En un sistema continuo es posible que se trabaje en conjunto, requiriéndose la participación de varias regiones para una sola ejecución. En este sentido podemos pensar que hacen falta lesiones selectivas combinadas en otras estructuras para lograr el impedimento del aprendizaje del CAS.

**ESTO
CALA
DE
LA
BIBLIOTECA**

10. Conclusiones.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que:

- A) La inmunotoxina 192 IgG saporina tiene un efecto claro en la disminución de la actividad colinérgica en la corteza insular.
- B) Esta disminución en la actividad colinérgica es producto de la destrucción selectiva de neuronas colinérgicas en el NBM.
- C) La destrucción masiva de células colinérgicas que portan el receptor de baja afinidad p75, está asociada con la denervación de la corteza insular.
- D) La denervación de las fibras colinérgicas que portan el receptor p75 no es importante para el aprendizaje del CAS.

Referencias

- Aggleton, J.P., Petrides, M. e Iversen, S.D. (1981) Differential effects of amygdaloid lesion on conditioned taste aversion learning by rats. *Physiol. Behav.* 27, 397-403.
- Baratti, C.M., Introini, I.B., y Huygens, P. (1984) Possible interaction between central cholinergic muscarinic and opioid peptidergic systems during memory consolidation in mice. *Behav. Neural Biol.* 40, 155-69.
- Baxter, M. G., Bucci, D. J., Gorman, L. K., Wiley, R. G., Gallagher, M. (1995) Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats. *Behavioral Neuroscience.* 109, 714-722.
- Beninger, R.J., Kuhnemann, S., Ingles, J.L.; Jhmandas, K., y Boegman, R.J. (1994) Mnemonic deficits in the double Y-maze are related to the effects of nucleus basalis injections of ibotenic and quisqualic acids on choline acetyltransferase in the rat amygdala. *Brain Research Bulletin.* 35,147-152.
- Berger-Sweeney, J., Heckers, S., Mesulam, M.M., y Wiley, R.G. (1994) Differential effects of spatial navigation of immunotoxin-induced cholinergic lesions of the medial septal area and nucleus basalis magnocellularis. *J. Neurosci.* 14, 4507-4519.
- Bermúdez-Rattoni, F. y Escobar, M.L. (1994) Nerve growth factor accelerates recovery of conditioned taste aversion learning by insular cortical grafts. En Kurihara, K. (Ed.), *Olfaction & Taste.* Tokio (pp. 475-478).
- Bermúdez-Rattoni, F., y Yamamoto, T. (1998). Neuroanatomy of CTA: lesion studies. In: Conditioned taste aversion. Memory of a special Kind. (Bermúdez-Rattoni, F., Yamamoto, T., y Bures, J., ed) Pp 28-44 New York: Oxford University Press.
- Bigl, V., Woolf, N.J., y Butcher, L.L. (1982) Cholinergic projection from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital and cingulate cortices: A combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase analysis. *Brain Research Bulletin.* 8, 727-749.
- Book, A. A., Wiley, R. G., y Schweitzer, J. B. (1992). Specificity of IgG-saporin for NGF receptor-positive cholinergic basal forebrain neurons in the rat. *Brain Research.* 590, 350-355.
- Book, A. A., Wiley, R.G., y Schweitzer, J.B. (1994) 192 IgG-saporin: Specific lethality for cholinergic neurons in the basal forebrain of the rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 95-102.
- Braun, J.J., Lasiter, P.S., y Kiefer S. W. (1982) The gustatory neocortex of the rat. *Physiol. Psychol.* 10, 13-45.
- Brinton, E. R. (1991) Biochemical correlates of learning and memory En Martínez, J. L., y Kesner, R. P. (Eds.), *Learning and memory (A biological view).* U.S.A. Academic Press. 2da edición. (pp. 199-257).
- Davies, P. (1985). A critical review of the role of the cholinergic system in human memory and cognition. *Ann-N-Y-Acad-Sci.* 444, 212-7.
- Davis, K. L., Mohs, R. C., Rosen, W. G., Greenwald, B.S., Levy, M. I., (1983) Memory enhancement with oral physostigmine in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 308,721.
- Deutsch, J.A. (1971). The cholinergic synapse and the site of memory. *Science.* 174, 788-794.
- Drachman, D.A. y Leavitt, J. (1974) Human memory and the cholinergic system. *Arch. Neurol.* 30,113-121.
- Drachman, D.A y Sahakian, B.J. (1980) Memory and cognitive function in the elderly. A preliminary trial of physostigmine. *Arch. Neurol.* 37, 674-675.

Dudai, Y. (1990). The neurobiology of memory. Oxford University Press. pp. 43,242-243,248.

Dunnet, S.B., Whishaw, I.Q., Jones, G.H., y Bunch, S.T. (1987) Behavioural, biochemical and histological effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats. *Neuroscience*. 20,653-659.

Dunnet, S.B., Everitt, B.J., Robbins, T.W. (1991) The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends Neurosci*. 14(11), 494-500.

Escobar, M. L. (1994). El factor de crecimiento neuronal en el sistema nervioso central. *Ciencia*. 45, 21-34.

Everitt, B. J., y Robbins, T. W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annu. Rev. Psychol.* 48, 649-684.

Flood, J.F., Landry, D.W., y Jarvik, M.E. (1981) Cholinergic receptor interactions and their effects on long-term memory processing. *Brain Res*. 215,177-85.

Flood, J. F., Cherkin, A. (1986) Scopolamine effects on memory retention in mice: a model of dementia? *Behav. Neural. Biol.* 45, 169-184.

Gutiérrez, G. H. (1996) Disfunción cognitiva e inactivación colinérgica cortical mediante el bloqueo endógeno del factor de crecimiento neuronal. Tesis de Maestría. UACPyP del CCH. UNAM.

Hagan, J.J., Tweedie, F., Morris, R. G. M. (1986) Lack of task specificity and absence of posttraining effects of atropine on learning. *Behav. Neurosci.* 100, 483-493.

Kiefer, S.W., y Brown, J.J. (1979) Acquisition of taste avoidance habits in rats lacking gustatory neocortex. *Physiol. Psych.* 7,245-250

Kiefer, S. W. (1985) Neural mediation of conditioned food aversions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 443,100-109.

López-García, J. C., Fernández-Ruiz, J., Escobar, M.L., Bermúdez-Rattoni F., y Tapia, R. (1991) Effects of excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 45, pp. 147-152.

López-García, J. C., Ruiz, J.F., Escobar, M.L.; Rattoni, F. B., y Tapia, R. (1993) Effects of excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 45(1) 147-152.

Mallet, P.E., Beninger, R. J., Flescher, S.N., Jhamandas, K., y Boegman, R. J. (1995) Nucleus basalis lesions: implication of basoamygdaloid cholinergic pathways in memory. *Brain Res. Bull.* 36, 51-56.

Markowska, A.L., Wenk, G.L., Olton, D.S. (1990) Nucleus basalis magnocellularis and memory: differential effects of two neurotoxins. *Behav. Neur. Biol.* 54, 13-26

Mc Gaugh, J. L. (1989) Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annu. Rev. Neurosci.* 12, 255-87.

Muir, J.L., Page, K.J. Sirinathsinghji, D.J.S., Robbins, T.W., Everitt, B.J. (1993) Excitotoxic lesions of basal forebrain cholinergic neurons: effects on learning, memory and attention. *Behav. Brain Res.* 57, 123-131.

Naor, C. y Dudai, Y. (1996) Transient impairment of cholinergic function in the rat insular cortex disrupts the encoding of taste in conditioned taste aversion. *Behav. Brain Res.* 79, 61-67.

Saper, C.B. (1984) Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. magnocellular basal nucleus. *J. Comp. Neurol.* 222,313-342.

Sinden, J.D., Hodges, H., y Gray, J.A. (1995) Neural transplantation and recovery of cognitive function. *Behav. brain. sci.* 18, 10-35.

Squire, L. R., y Davis, H. P. (1981) The pharmacology of memory A neurobiological perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21, 323-56.

Torres, E. M., Perry, T. A., Blokland, A., Wilkinson, L. S., Wiley, R. G., Lappi, D. A., y Dunnett, S.B. (1994) Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system. *Neuroscience* 63, 95-122.

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

Waite ,J.J., y Thal, L.J. (1996) Lesions of the cholinergic nuclei in the rat basal forebrain: excitotoxins vs an immunotoxin. *Life Science.* 58, 1947-1953.

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

Wenk, G.L., Stoehr, J.D., Quintana, G., Mobley, S. y Wiley, R.G.(1994) Behavioral, biochemical, histological and electrophysiological effects of 192 IgG saporin injections into the basal forebrain of rats. *J. Neurosci.* 14, 5986-5995.

Wenk, G.L., Stoehr, J.D., Mobley, S.L., Gurney, J. Y Morris, R.J. (1996) Age-related decrease in vulnerability to excitatory amino acids in the nucleus basalis. *Neurobiol. Agi.* 17, 1-7.

Wolf, N.J., Eckenstein, F., y Butcher, L.L. (1984) Cholinergic systems in rat brain: I. Projections to the limbic telencephalon. *Brain. Res. Bull.* 13, 751-784.

Wolf, N.J., y Butcher. L.L (1986) Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain Res. Bull.* 23, 519-540.

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

Wiley, R. G., Oeltmann, T. N., y Lappi, D.A. (1991). Immunolesioning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor. *Brain Research.* 562, 149-153.

Wiley, R. G. (1992) Neural lesioning with ribosome-inactivating proteins: suicide transport and immunolesioning. *Trends in Neurosci.* 15,285-290.

Yamamoto, T., Matsuo, R., y Kawamura Y.(1980) Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. *J. Neurophysiol.* 44, 440-454.