

3  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES DE POSGRADO DEL I. E. H

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA NEOCORTEZA GUSTATIVA  
EN RATAS NORMALES Y TRANSPLANTADAS  
CON TEJIDO CEREBRAL FETAL

LICENCIADO  
(INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA)

JUAN CARLOS LÓPEZ GARCÍA  
TESIS PROFESIONAL

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1989



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

RESUMEN .....	3
BREVE HISTORIA DE LOS TRANSPLANTES DE TEJIDO CEREBRAL .....	4
FISIOLOGIA DE LOS TRANSPLANTES AL CEREBRO	
Condiciones óptimas para la supervivencia de los implantes .....	7
Crecimiento y organización .....	13
Mecanismos de funcionamiento .....	18
LOS TRANSPLANTES AL CEREBRO Y EL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES	
El condicionamiento aversivo a los sabores como proceso de aprendizaje .....	21
Neuroanatomía general y del condicionamiento aversivo a los sabores .....	24
Comparación del CMS inducida por los implantes .....	31
NEUROTRANSMISORES EN LA CORTEXA CEREBRAL .....	34
OBJETIVOS .....	36
RESULTADOS .....	37
Trabajo 1: Neurotransmitters of the gustatory neocortex: synthesis and release of acetylcholine, GABA, dopamine and glutamic acid .....	38
Trabajo 2: Correlations between acetylcholine release and conditioned taste aversion recovery induced by fetal neocortex grafts .....	36
DISCUSION GENERAL .....	77
REFERENCIAS .....	80

## RESUMEN

La promediana gustativa (NG), situada en la base del encefalo en la via gustativa, es un componente del sistema nervioso central involucrado en la integracion de los estulos alimenticios.

Estudios previos han demostrado que lesiones de esta estructura provocan una perdida del aprendizaje en el paradigma conductual conocido como condicionamiento operante a los sabores (COAS). De igual forma, se ha encontrado que trasplantes de NG fetal al cerebro de ratas lesionadas en esta estructura promueven recuperacion de la capacidad de aprendizaje previamente perdida. Los mecanismos responsables de este proceso son desconocidos.

En el presente trabajo, utilizando el mismo modelo de recuperacion funcional, se trato de determinar si los trasplantes de tejido cerebral fetal a la NG poseen las mismas propiedades bioquimicas que la neurona intacta. El objetivo final del trabajo es encontrar un mecanismo neuroquimico que pueda relacionarse con el fenomeno de recuperacion observado.

Para lograr el objetivo tratado, se trabajo en dos partes: en primer lugar, se caracterizo bioquimicamente a la NG en animales intactos determinando patrones de liberacion, de sintesis y de degradacion de diversos neurotransmisores y, en segundo, se realizo la misma serie de experimentos en los trasplantes, comparando las actividades obtenidas en estos con las observadas en el tejido adulto.

Los resultados obtenidos indican que la NG de ratas adultas es capaz de liberar, sintetizar y degradar dopamina (DA), acetilcolina (ACh) y acido glutamico de manera dependiente de calcio. Por otra parte, se encontro que la NG tiene considerable actividad de las enzimas descarboxilasa del acido glutamico, colina acetiltransferasa y acetilcolinesterasa, responsables de la sintesis del GABA y de la sintesis y la degradacion de la ACh, respectivamente.

Los resultados con trasplantes pueden dividirse en dos: los obtenidos con trasplantes homotipicos (NG fetal a NG adulta) y los obtenidos con trasplantes heterotipicos (tejido ectopico fetal a NG adulta). En el primer caso, los trasplantes indujeron recuperacion conductual de acuerdo a lo previamente establecido y la liberacion de los neurotransmisores mencionados fue muy similar a la observada en la NG intacta. En el segundo, los trasplantes no fueron capaces de promover restablecimiento del aprendizaje y tampoco presentaron liberacion de ACh. Mas aun, aquellas ratas que recibieron trasplantes homotipicos y que no recuperaron la conducta, tampoco liberaron ACh.

Estos hallazgos, aunados al hecho de que interferencia farmacologica sobre el sistema colinergico de la NG produce bloqueo de la adquisicion del aprendizaje, hacen pensar que la ACh esta involucrada en la recuperacion del COAS mediante los trasplantes en este modelo.

## BREVE HISTORIA DE LOS TRANSPLANTES DE TEJIDO CEREBRAL

El estudio de los trasplantes al cerebro ha cobrado un gran auge durante las últimas dos décadas. La importancia radica en el hecho de que son un sistema experimental muy adecuado para estudiar la regeneración del sistema nervioso dañado (1) y de plasticidad y desarrollo del cerebro fetal o neonato (2). Inclusive en el ámbito de la terapéutica celular, la investigación sobre trasplantes ya ha ofrecido frutos entre los que destaca el tratamiento del Mal de Parkinson por medio de autotrasplantes de médula adrenal al cerebro de pacientes con dicha enfermedad (3).

Desde una perspectiva histórica, el estudio de los trasplantes de tejido cerebral se remonta a finales del siglo XIX (Tabla I). El objetivo principal perseguido por los primeros trabajos experimentales descriptivos, estudiar la capacidad de los implantes para sobrevivir en un medio distinto al natural y averiguar si el cerebro era un lugar adecuado para el crecimiento de tejido transplantado. Así, en 1890, transfiriendo tejido neocortical de gatos a perros adultos, N.E. Thompson observó que era posible la supervivencia, al menos parcial, de tejido extraño en un cerebro íntegro hasta siete semanas después de la cirugía (4).

Foremann, en 1923, fue el primero en reportar que el tejido transplantado tenía acciones neurotróficas sobre el cerebro huésped (5). El investigador implantó tejido cerebral de conejos adultos en la proximidad de un nervio periférico previamente seccionado y, aunque no observó supervivencia del trasplante, encontró que los axones en regeneración eran atraídos hacia el

interior del tubo que contenía a las células injeridas. Además, estableció que esta célula "neurótica" solo era observada cuando el tejido implantado tenía un origen neuronal.

En 1907, Delgado realizó el primer intento de transplantar tejido embrionario al sistema nervioso (6). Desafortunadamente, el tejido que utilizó era de un origen ajeno al cerebro (gigante y rífido), por lo que no pudo observar crecimiento del implante sino su degeneración en todos los casos. Solo tales resultados, concluyó que el cerebro no era un sitio apropiado para la supervivencia de tejido embrionario implantado. Dos años después, Ranson transplantó ganglios espinales de animales neonatos al cerebro de ratas adultas, observando una sobrevivencia, al menos parcial, de las neuronas neuronales dentro de la corteza de los huéspedes (7). Este puede considerarse como el primer caso exitoso de trasplante de ganglio espinal al cerebro.

El primer trasplante de nervio periférico al sistema nervioso central (SNC) se realizó con éxito en 1911 y es atribuido al investigador español F. Tello (8), quien encontró que segmentos de nervio periférico transplantados - la corteza cerebral de ratas adultas con capacidad de promover regeneración de fibras de neuronas centrales.

En 1917, la norteamericana E. Dunn tomó trozos de corteza de ratas de 7 días de edad y los transplantó a cavidades previamente hechas en el cerebro de animales obtenidos de la misma camada (9). Aunque el grado de supervivencia que encontró fue bastante bajo, los trasplantes viables habían retenido las características propias del tejido cortical e inclusive se

observaba cierta diferenciación de las neuronas sobrevivientes. Con estos experimentos demostró que el cerebro sí era un lugar adecuado para la supervivencia de tejido transplantado, a diferencia de lo que había encontrado Del Conte diez años atrás.

En 1940, Loewen Clark realizó experimentos muy similares a los de Dunn pero con cachos mayor éxito. La diferencia consistía en que el tejido transplantado por aquí fue obtenido de ratos. En este caso, el crecimiento, la supervivencia, la diferenciación neuronal y la organización intrínseca del transplante eran mucho mejores que las observadas anteriormente (19).

El primer investigador en avanzar de un plano descriptivo hacia el estudio de interacciones funcionales entre transplante y huésped, fue Malax en 1942, casi tres cuartos de siglo después del primer intento de transplante al cerebro (11). Además de ser de los primeros investigadores en transplantar hacia una cavidad que existe naturalmente en el cerebro (los ventrículos), demostró que la supervivencia y la funcionalidad de transplantes de hipófisis sólo se observaba cuando el tejido era colocado en la proximidad de la llamada "área hipofisiotrófica" del hipotálamo medialbasal, donde el implante podía ser afectado por factores liberados de dicha región del cerebro huésped.

Paradójicamente, el trabajo de todos estos pioneros no fue muy importante para la historia moderna de los transplantes, lo cual es probablemente debido a que la mayoría de los resultados obtenidos por aquéllos demostraban que el tejido transplantado tenía una supervivencia muy limitada aún en el mejor de los casos además de que los resultados no siempre eran reproducibles. Por otra parte, la visión prevalente en aquellos tiempos

establecer que, por definición, el cerebro era un órgano en el que el crecimiento y el desarrollo simplemente no ocurrían, por lo tanto, los estudios encaminados a contender dicha postura eran tomados como pura serbia o sencillamente ignorados.

Es hasta 1947 cuando tal dogma es finalmente puesto en tela de juicio por Berman (10), quien reportó la primera evidencia ultraestructural de la existencia de "turnover" en el septum desahortado. Esto, unido al advenimiento de nuevas técnicas autoradiográficas e inmunohistoquímicas, abrió como consecuencia que se reconociera la capacidad regenerativa del tejido nervioso, dando lugar al inicio de la era moderna en el estudio de los trasplantes al cerebro.



**TABLA I. ALGUNOS TRABAJOS IMPORTANTES EN LA HISTORIA DE LOS TRANSPLANTES AL CEREBRO.**

1890	W.G. Thompson	Primer intento de transplantar tejido adulto al SNC
1898	J. Forssman	Primer reporte sobre efectos neurotróficos del tejido implantado
1907	G. Del Conte	Primer trasplante de tejido embrionario al cerebro
1909	W. Ranson	Primer trasplante exitoso de ganglio espinal al cerebro
1911	F. Tello	Primer trasplante exitoso de nervio periférico al cerebro
1917	E. Dunn	Primer trasplante exitoso de tejido neonatal al cerebro
1921	Y. Shirai	Primera evidencia de que el cerebro es un "sitio inmunológicamente privilegiado"
1924	G. Faldino	Primer trasplante exitoso de tejido fetal a la cámara anterior del ojo
1940	W.E. Le Gros Clark	Primer trasplante exitoso de tejido fetal al CNS
1957	B. Flerko & J. Szentagothai	Primer trasplante intraventricular de tejido endocrino
1970	L. Olson & A. Seiger, G.D. Das & J. Altman, A. Björklund & U. Stenevi	Primeros reportes sobre las condiciones adecuadas para realizar trasplantes al cerebro
1984	L. Olson & cols.	Primer trasplante de médula adrenal al cerebro humano
1986	I. Madrazo & cols.	Primer trasplante exitoso de médula adrenal al cerebro de pacientes con Enfermedad de Parkinson

Modificada de la ref. 21

## FISIOLOGIA DE LOS TRANSPLANTES AL CEREBRO

### Condiciones internas para la sobrevivencia de los implantes.

Los primeros grupos que retomaron la idea de estudiar regeneración y plasticidad empleando como modelo los trasplantes de tejido cerebral estaban interesados en establecer las condiciones apropiadas para obtener la máxima supervivencia del tejido implantado, principal carencia de los primeros reportes. Tales condiciones fueron publicadas en 1970 por Bill Stenevi y cols. (13). Este grupo empleó técnicas de detección histoquímica de catecolaminas para investigar el destino de tejido trasplantado vivo en este tipo de modelos colocado en diferentes regiones del sistema adulto y tomado de donadores de distintas edades. Encontraron que eran tres los factores que influyen críticamente sobre la supervivencia de los trasplantes: en primer lugar, el tejido trasplantado sólo es viable cuando cumple una de estas características: si es tomado de donadores adultos, sólo tejido del sistema nervioso periférico puede sobrevivir y crecer dentro del huésped; si es tomado de donadores juveniles (principalmente ratas), el tejido puede sobrevivir aún procediendo del SNC. Más aún, en este último caso existe un periodo específico en el que dicha estabilidad puede obtenerse, pasado el cual la supervivencia del trasplante disminuye marcadamente. Dicho periodo coincide con la etapa en la que la división celular está a punto de detenerse y en la cual el crecimiento de neuritas está en su apogeo (Fig. 1) (14). La edad del huésped, por el contrario, parece jugar un papel secundario

en la supervivencia de los trasplantes. Hallas y cols. (15) encontraron que, al transplantar tejido embrionario de una edad constante a animales de diferentes edades, los trasplantes se desarrollan ligeramente mejor en los receptores más jóvenes (5 días de nacidos) que en los animales adultos (180 días de edad) (fig. 2). De este modo, los autores concluyen que el crecimiento del trasplante se ve favorecido en el cerebro de animales en desarrollo.

El segundo factor establecido por Stenevi y cols. concierne al sitio dentro del cerebro huésped en el cual se depositará el tejido transplantado. La característica principal que debe poseer dicho lugar es la de estar altamente vascularizado. Existen en el cerebro cavidades naturales, como los ventrículos, que cumplen con tal requisito; alternativamente, se puede preparar una cavidad que reciba al implante. Dicha cavidad se revasculariza al cabo de un par de semanas constituyéndose como un sitio adecuado para sostener el crecimiento del tejido. De este modo, los vasos sanguíneos que recubren la cavidad dotarán al trasplante con el aporte sanguíneo necesario para su supervivencia. Por otro lado, Björklund y cols. (16), trabajando con suspensiones de células de sustancia nigra implantadas en el parénquima cerebral, han reportado que dichos trasplantes son capaces de sobrevivir y de reinnervar al estriado desaferentado aún cuando no han sido colocados en una cavidad previamente preparada. En la figura 3 se muestran las diferentes técnicas que se utilizan actualmente en la investigación con trasplantes.

El tercer factor encontrado por Stenevi y cols. tiene que

ver con el rechazo inmunológico al que se ven sujetas las células que forman el implante. Contrariamente a lo que podría esperarse, las reacciones inmunológicas inducidas por los trasplantes no afectan el desarrollo normal de los mismos, es decir, el cerebro huésped acepta al tejido extraño a diferencia de lo que ocurre con trasplantes de cualquier otro órgano. Desde sus primeros experimentos, los investigadores citados encontraron que en los casos en los que se observaba rechazo del trasplante, el fenómeno era debido a procesos infecciosos causados por deficiencias en el proceso quirúrgico y no a una reacción inmunológica. Más aún, desde 1921 se realizaron los primeros estudios sobre trasplantes con un enfoque inmunológico (17). Tales trabajos fueron los que darían pie al concepto del cerebro como "sitio inmunológicamente privilegiado". Sólo en los casos en los que el donador y el receptor pertenecen a distinta especie (xenotrasplantes), es posible observar rechazo del tejido. Brundin y cols. (18) han encontrado que dicho fenómeno puede evitarse mediante el empleo de drogas inmunosupresoras como la ciclosporina A. Bajo estas condiciones, se ha observado que el tejido transplantado puede inducir recuperación conductual en el animal receptor aún procediendo de otra especie.

Fig. 1. - RELACION ENTRE LA EDAD DEL DONADOR Y EL CRECIMIENTO FINAL DEL TRANSPLANTE (A) Un volumen constante de tejido testicular tomado de ratones de diferentes edades (indicadas por el número al lado de cada corte) fue implantado en el cerebelo de ratos de diez días de nacidos. 30 días después, los animales fueron sacrificados y el crecimiento del transplante (T) fue analizado. Nótese la reducción gradual en el crecimiento del transplante a medida que el tejido es obtenido de ratos más desarrollados. (B) Relación entre el volumen final del transplante y la edad del feto donador. El eje de la derecha indica el incremento porcentual del volumen de los transplantes con respecto al tejido originalmente implantado. (Figura tomada de la ref. 14).

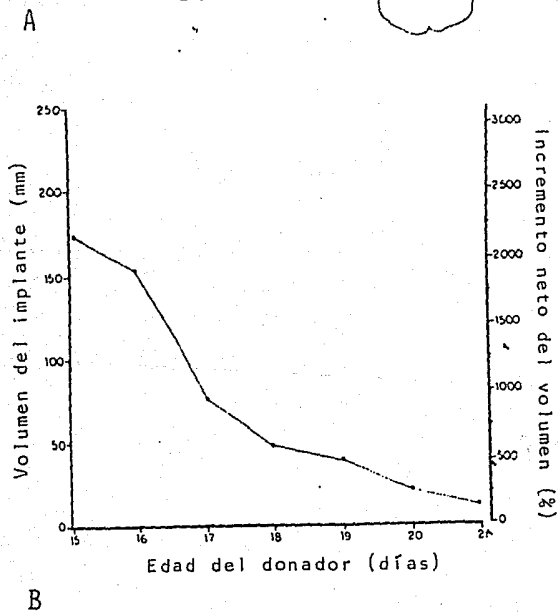
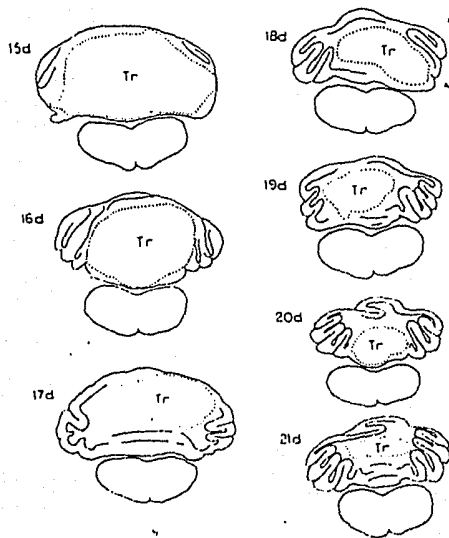
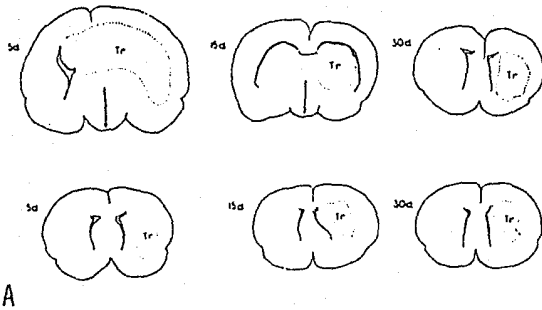
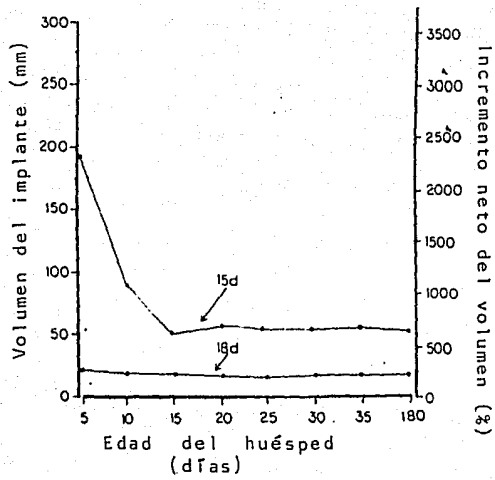


FIGURA 1

Fig 2.- RELACION ENTRE LA EDAD DEL UNICEMO Y EL CRECIMIENTO FINAL DE LOS TRANSPLANTES (A) Tejido mesodermico embrionario de 15 (parte superior) y de 10 (parte inferior) dias de gestacion fue implantado en el cerebro anterior de ratas de diferentes edades (indicadas por el número al lado de cada corte). 70 dias después de la cirugía el crecimiento de los transplantes fue analizado. Obsérvase el mayor volumen de los implantes de 15 días de gestación y el mayor crecimiento conforme el animal receptor es más joven. (B) Relación entre la edad de la rata transplantada y el volumen final del tejido implantado. El eje de la abscisa muestra el incremento porcentual en el volumen con respecto al tejido originalmente implantado. (Figura tomada de la ref. 10).



A



B

FIGURA 2



Fig. 3.- SECUENCIA DE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS PARA TRANSPLANTAR TEJIDO CEREBRAL PETAJE AL CEREBRO ADULTO. El tejido, tomado en forma de bloque, puede colocarse en una cavidad natural del cerebro (los ventrículos, por ejemplo) a través de una cánula (A). De manera alternativa, puede colocarse en una cavidad operada artificialmente por medios mecánicos (B) químicos o químicos (con una neurotoxina). De igual forma, el tejido puede disgregarse antes de ser implantado, empleando métodos enzimáticos (tratamiento con tripsina) o mecánicos (C). De esta forma, el daño producido al huésped se minimiza. Esta última técnica se ha empleado principalmente en estudios de desarrollo del sistema nervioso.

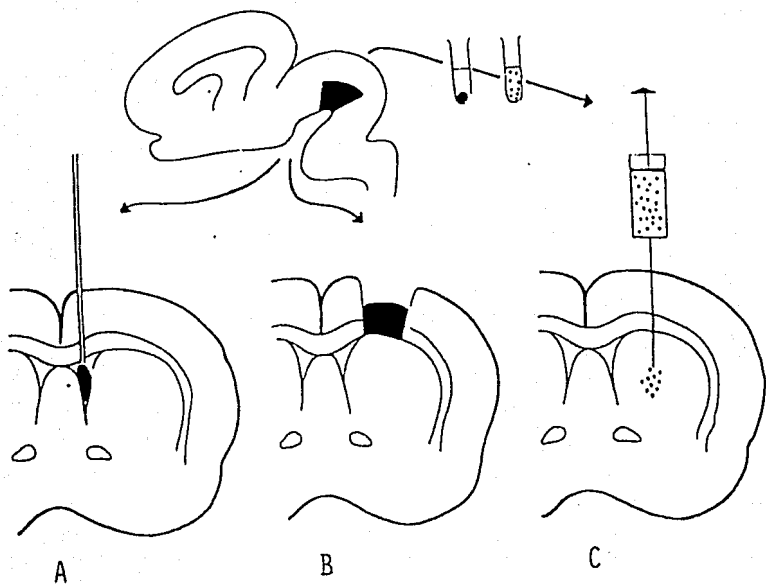


FIGURA 3

## Crecimiento y diferenciación de las células.

¿Qué transición favorecen la diferenciación y el desarrollo del tejido implantado? En primer lugar, en el desarrollo, la integración del transplante se va formando cuando el tejido donde se implanta del embrión sobrevive embrionario (ver arriba). Jagger y Lund (19) encontraron que, entre las principales razones para ello se encuentra el hecho de que la mayoría de las células que conforman el implante aún conservan capacidad proliferativa; es decir, se trata de células neuroepiteliales, las cuales continúan dividiéndose con después de transplantadas. Gracias a dicha capacidad, el transplante crece y sus posibilidades de supervivencia se van aumentando paulatinas (fig. 1). En un segundo estudio, el investigador sueco L. W. Bremer y cols. (20) realizaron una serie de experimentos en los que explantaron el crecimiento y la organización de transplantes de regiones del cerebro fetal con distinta organización citoarquitectónica al ser colocadas en una cavidad previamente hecha en la corteza cerebral de animales adultos. Además de encontrar resultados similares a los de Jagger y Lund, demostraron que las células que ya han alcanzado cierto grado de diferenciación son capaces de mantener el arreglo citoarquitectónico que hubieran poseído en el adulto, independientemente del sitio del cerebro donde han sido transplantadas.

Por otra parte, las células embrionarias son capaces de soportar prolongados periodos de anoxia y de daño mecánico que se produce al disecar el tejido es mucho menor que el ocasionado al cerebro adulto (21).

El huésped también juega un papel importante en la supervivencia del injerto. Alente de observarlo con un adecuado riesgo sanguíneo, estudios hechos con extractos obtenidos de lesiones cerebrales han demostrado la existencia de factores solubles que favorecen la supervivencia de sus células y que promueven el crecimiento axonal y dendrítico en las mismas (22). Aunque la identidad de dichos factores es desconocida, existe evidencia de que el factor de crecimiento nervioso está implicado en el proceso mencionado (23).

Resumiendo, el crecimiento y la organización intrínseca del tejido transplantado puede variar en función de una gran variedad de parámetros: diferencias en el proceso de disección, en el volumen de tejido transplantado, en el estado de diferenciación en el que se encuentran sus células y propiedades del sitio donde el tejido será colocado.

Otro aspecto importante en el estudio de la organización de los trasplantes al cerebro es la capacidad de estos últimos de establecer comunicación con el huésped. Esta comunicación puede establecerse de varias maneras, siendo las principales la participación de conexiones solubles y el establecimiento de conexiones entre trasplante y huésped. De estas dos formas de interacción mencionadas es esta última la que ha sido más extensivamente estudiada.

La existencia de contactos sinápticos entre ambos tejidos resulta importante debido a que parece ser uno de los mecanismos responsables de los efectos funcionales atribuidos a los trasplantes. Las dos aproximaciones metodológicas más empleadas

en este tipo de estudios han sido de carácter neuroanatómico (transferencia de vías nerviosas), microscopía de luz y electrónica y técnicas (neuroquímicas) (24-26), de carácter electrofisiológico (27).

Una de las características más relevantes del establecimiento de conexiones entre el trasplante y el huésped es su grado de especificidad. En uno de los primeros trabajos en los que se estudió la capacidad de regeneración de una estructura cuyas fibras aferentes habían sido lesionadas, Bjorklund y Cole (28) estudiaron las conexiones que se forman entre trasplantes de diferentes tipos celulares con el hipocampo previamente desnervado. Los investigadores obtuvieron que, al trasplantar estructuras que proyectan normalmente al hipocampo huésped, los patrones de regeneración eran muy similares a los que se observan en un animal intacto. Por el contrario, cuando se implanta un tejido que no se proyecta al hipocampo en condiciones normales, no encuentran fibras del trasplante en el huésped. Estos resultados les indicaron que el trasplante es capaz de establecer sinapsis con neuronas del huésped y que el número de contactos es proporcionalmente aumentado cuando las proyecciones nativas que recibe la estructura huésped han sido eliminadas. Las nuevas conexiones conservan la organización que se observa en el animal intacto. La funcionalidad de estos contactos se ha estudiado analizando el patrón de descarga de las células del trasplante (27) o estimulándolo, registrando potenciales en estructuras que presumiblemente reciben aferencias de aquí (29).

## Mecanismos de Neurobiología de los Transplantes.

La estrecha relación existente entre el huésped y el transplante se manifiesta funcionalmente en la conducta del animal receptor de muy diversas maneras. ¿Cuál es el mecanismo responsable de los efectos fisiológicos producidos por el tejido implantado? Una gran cantidad de estudios han revelado diversos mecanismos mediante los cuales el transplante modifica la conducta del animal receptor (31,32):

a) Efectos conductivos del transplante. Este tipo de efectos se pueden manifestar de diversas maneras: el transplante puede crecer excesivamente comprimiendo las estructuras que lo rodean, interfiriendo de este modo con su correcto funcionamiento. De igual manera, el transplante puede inducir cambios degenerativos del parénquima conectivo del huésped, formación de cicatrices o alteraciones en la barrera hematoencefálica (31). Este tipo de alteraciones se manifiestan a nivel conductual como trastornos locomotores o de aprendizaje. Por ejemplo, Stephen Dunnett ha encontrado deficiencias en la recepción de laberintos en animales con transplantes neocorticales que han crecido excesivamente (32).

b) Acciones tróficas del transplante sobre el cerebro huésped. Las neuronas injertadas tienen capacidad de liberar sustancias tróficas que pueden actuar sobre las células del receptor. Este hecho previene la muerte neuronal en un cerebro que ha sufrido daño (33) y puede favorecer la regeneración axonal y el restablecimiento de conexiones entre neuronas del huésped (34). La existencia de este tipo de mecanismo de acción se ve

grandemente apoyada por experimentos en los cuales se han trasplantado células de múltiples tipos de neuronas los cuales son capaces de inducir recuperación en animales con ablaciones de la corteza frontal (30).

c) Liberación difusa de hormonas o neurotransmisores. Los efectos terapéuticos obtenidos con trasplantes de médula supratentorial al cerebro de pacientes con Mal de Parkinson (31) podrían explicarse igualmente como modo de acción. Las células en el trasplante simplemente liberan factores humoriales al medio (neurotransmisores y hormonas) y las neuronas sensibles a las moléculas expulsadas recuperan su actividad. En modelos animales se ha observado que los trasplantes intraventriculares del área preoptica que contienen altas cantidades de hormona liberadora de gonadotropinas son capaces de establecer funciones gonadales normales en animales con deficiencias genéticas en la producción de dicha hormona (35).

d) Reintegración de conexiones del huésped con neurotransmisores del trasplante. Las conexiones funcionales mencionadas con anterioridad ejercen efectos sobre circuitos neuronales del huésped. La ocurrencia de una liberación de neurotransmisores tónica y autoregulada en estos contactos sinápticos puede ser suficiente para que la neurona postsináptica sea nuevamente funcional (30). Evidencia de este tipo se ha encontrado en los trabajos de Melton y cols. (36) y de Björklund y cols. (28,37), trabajando con hospederos neonatos y previamente denervados, respectivamente.

e) Establecimiento de conexiones capriciosas entre huéspedes y

transplante. Diversos grupos han observado una integración más completa del trasplante al cuerpo pedúnculo (36). Los mejores resultados se han observado con receptores que aún se encuentran en desarrollo o que tienen una dependencia de sus aferencias nerviosas por medio de las lesiones.

Es evidente que la recuperación funcional observada en los distintos modelos no puede explicarse invocando a uno solo de los mecanismos arriba mencionados. En la mayoría de los casos, el restablecimiento de una función es multifactorial. Del mismo modo, no puede pensarse que uno de los mecanismos sea más importante que otro. El punto específico de los diversos modos de acción depende del modelo experimental del que se trata.



## LOS TRANSPLANTES AL CEREBRO Y EL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS SABORES

El condicionamiento aversivo a los sabores como proceso de aprendizaje

Dentro de una cadena alimenticia todo individuo nace para comer y, eventualmente, ser comido. Las especies han desarrollado eficientes métodos para retardar al máximo posible convertirse en plato de otros, al grado hasta de una cámara (30). De este modo, una serie de plantas y sus animales producen toxinas activas para sus depredadores. Los ovillos los protegen eficientemente del ataque de éstos. A su vez, los depredadores necesitan mecanismos de defensa para evitar el daño que les produce la ingestión de dichas plantas y animales (como el dala, por ejemplo), además de parasitoides evaluar los efectos nutritivos que pueda proporcionar dicho alimento (37). Uno de los principales y más estudiados mecanismos desarrollados por estas especies es el aprendizaje (38). Un animal puede asociar el malestar gástrico que le produce la ingestión de determinado alimento con el sabor del mismo, evitando de esta forma su subsiguiente ingestión. A este proceso de aprendizaje, que involucra la convergencia de información gustativa con información visceral, se le conoce como condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) (41).

Desde un punto de vista evolutivo, el CAS confiere una ventaja selectiva que resulta obvia: aquellos animales que resulten dañados con la ingestión del alimento y puedan asociar su sabor con el malestar sobrevivirán mejor que aquellos que vacilen

a consecuencia de subsiguientes toxicidads. Más aun, las ventajas de este tipo de procedo se hacen patentes toda vez que el animal sufre cualquier deficiencia de la ingesta, es decir, desde la primera vez que el animal se enfrenta con el alimento. En una primera exposición, el organismo consumirá la comida en pequeñas cantidades y expandirá su ingesta en largos periodos de tiempo. Esta fenómeno se conoce como aversión y también supone un proceso de aprendizaje y memoria (la cooperación del presente sabor con otros a los que el animal ha sido expuesto a lo largo de su historia). Su importancia evolutiva radica en el hecho de que, si el alimento resulta tóxico y el animal muere por haber consumido grandes cantidades del mismo, las probabilidades de que tenga descendencia se disminuyen. En cambio, si el animal ha consumido dosis subletales de la toxina, puede sobrevivir excluyendo de su dieta el alimento que le ha producido el malestar (42).

Las bases fisiológicas del CNS empezaron a conocerse desde su descubrimiento en 1966 por John Garcia (43). Este investigador realizó experimentos en los cuales expuso a diferentes grupos de ratas a uno de dos distintos estímulos condicionados: uno gustativo (el sabor del líquido en un bebedero) o uno auditivo (un tono que se producía cuando el animal tomaba del bebedero). Inmediatamente después, apareó los dos estímulos con náusea inducida con LiCl o con rayos X (estímulo incondicionado). Cuando volvió a presentar el estímulo correspondiente a cada grupo de ratas, encontró que sólo los animales que habían recibido el estímulo gustativo habían desarrollado aversión (respuesta

condicionada), mientras que los que recibieron el tono como estímulo condicionado ingirieron considerables cantidades de líquido. Del mismo modo, realizó otros series de experimentos en los cuales presentó los mismos estímulos condicionados asociados esta vez con otro estímulo incondicionado, un choque eléctrico. En este caso, obtuvo que los animales habían desarrollado aversión al tono y no al sabor.

Basado en estos experimentos, Garcia concluyó que las especies han generado mecanismos que les permiten asociar las consecuencias internas de la ingesta con el gusto y no con otras modalidades sensoriales. Del mismo modo, establecen relaciones entre estímulos audiovisuales con características del medio externo como el choque eléctrico. En última instancia, desde un punto de vista teleológico, la integración de la información visual y la gustativa les sirve para seleccionar adecuadamente su dieta y para integrar normalmente sus hábitos alimenticios.

## Neuroanatomía gustativa y del condicionamiento aversivo a los sabores

El OAS, como ya se ha establecido, implica a grandes rasgos de las siguientes partes: presentación del estímulo gustativo, producción de náusea, asociación de la náusea con el sabor del alimento, almacenamiento de la información, segunda presentación del gusto, recuperación de la información y rechazo. De este modo, se necesitan diversas estructuras anatómicas para llevar a cabo cada una de las partes mencionadas además de las necesarias para integrar los diferentes estímulos y construir las asociaciones correspondientes.

Un grupo de grupos de investigación se han dedicado a estudiar las bases neuroanatómicas de los diferentes procesos; es decir, han logrado establecer las estructuras encargadas de recibir la información gustativa, aquellas involucradas con la producción del reflejo emético y las encargadas estrictamente del proceso de aprendizaje y memoria.

Siguiendo la secuencia de eventos enlistada con anterioridad, las primeras estructuras que se ponen en juego en todo el proceso son las papilas gustativas de la cavidad oral (fig. 4). Estos receptores se encuentran principalmente en la lengua y están compuestos por células epiteliales modificadas las cuales están inervadas por una fibra nerviosa aferente cuyo soma neuronal se encuentra en el ganglio geniculado si la fibra proviene de los dos tercios anteriores de la lengua o en el ganglio petroso si proviene de su tercio posterior (43).

Estos nervios aferentes gustativos terminan en el núcleo del

trante colímbico (NTC). La importancia de esta estructura es que, además de constituirse en el primer relé central de la vía gustativa (44), es el núcleo en el que converge la información gustativa con la información visceral procedente del nervio vago. El centro emético, es decir, la estructura encargada de producir el reflejo del vómito también conocida como área postrema, se encuentra adyacente al NTC. De esta forma, la información que llega al NTC procedente del nervio vago y de la cavidad oral es capaz de arribar hasta el centro emético desencadenando el vómito (45). Un mecanismo alternativo de la producción de náusea lo constituye la vía sanguínea. Aquellas toxinas que penetren al torrente sanguíneo pueden interactuar con neuronas del centro emético y producir el mencionado reflejo (46). Curiosamente, todas las estructuras que se han mencionado forman parte del sistema nervioso periférico y del tallo cerebral. Es decir, las primeras etapas en la sensibilización del OAS son exclusivamente subcorticales. Dicho de otra forma, la simple sensación del sabor se procesa a nivel subcortical, sin necesidad de alcanzar centros superiores del encéfalo. Asimismo, se ha demostrado que animales descebrados, son capaces de presentar respuestas como respuesta a sustancias con un sabor agradable (lo que resulta en ingesta del líquido) del mismo modo que exhiben rechazo a aquéllas que presentan un sabor desagradable (hasta la lengua y abren la boca para que el líquido fluya hacia afuera) (46).

La siguiente etapa en el proceso es la adquisición del aprendizaje, lo cual se realiza en estructuras más centrales del encéfalo. Las neuronas del NTC proyectan caudalmente a células

de la llamada "zona pontina del gusto" o núcleo parabrachial del puente (47). Este núcleo está compuesto de una población heterogénea de células que, en su mayoría, son neuronas de proyección secundaría (48). Las proyecciones de esta estructura tienen tres destinos: las recibidas por neuronas del núcleo ventroposteromedial talámico (49), del complejo amigdalino (50) y de la corteza temporal.

La existencia de un relieve talámico a lo largo de la vía gustativa no es sorprendente. Todas las vías sensoriales en su camino a la corteza pasan a través del tálamo y la gustativa no es la excepción. Por otra parte, las proyecciones del área pontina a la amígdala no han sido bien caracterizadas, de forma tal que aún no se ha definido si existe un relieve verdadero o si sólo se trata de fibras de paso que la atraviesan en su camino rumbo a la corteza. Las axones que proyectan directamente del núcleo parabrachial a la corteza son muy escasos y no se ha podido detectar la presencia de péptidos en estas proyecciones a diferencia de lo que ocurre en los demás relieves de la vía (49). El papel que cada uno de estos diferentes paquetes de fibras de proyección juega en el procesamiento del CAS no ha sido estudiado.

La mayor parte de las conexiones de la vía gustativa que se establecen en la corteza (más del 90%) provienen del tálamo, específicamente de la parte paraventricular de su núcleo ventral posteromedial que, como su nombre lo indica, está compuesto de células pequeñas. Lesiones de esta estructura son capaces de impedir la adquisición del CAS, lo cual sugiere que este núcleo está involucrado en alguna parte del proceso de aprendizaje. Por

otra parte, existen proyecciones directas del nivel bajo hacia el alto, lo que también expresa la existencia de un proceso de integración de la información gustativa con la visual a este nivel (43).

Las células gustativas del tálamo proyectan a una región muy específica de la corteza temporal donde convergen el sabor visual y la vía táctil-cortical. Esta región forma parte de la neocorteza de asociación en los monos (áreas 13 y 14 de acuerdo con el sistema de Brodmann) y ha sido denominada **neocorteza gustativa (NG)** (fig. 5) (50). Los datos de esta estructura proveen pérdida del aprendizaje en un modelo experimental de CRC (51) e inyecciones de antagonistas del aprendizaje en esta área evitan la adquisición de la aversión al gusto (Lopez-Garcia y cols., datos no publicados).

En la figura 6 se presenta un resumen de los diferentes relevos implicados en el procesamiento de la información gustativa y en el proceso de aprendizaje del CAS.

Fig. 4. - ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE LAS PAPILAS GUSTATIVAS. Los receptores gustativos se encuentran en las papilas gustativas de la cavidad oral, las cuales contienen tres tipos de células (A). Las células basales dan lugar a las de soporte, las que a su vez se diferencian en receptores propiamente dichos. (B) Los receptores gustativos forman en su base un contacto sináptico con el nervio aferente que conduce la información gustativa hacia el sistema nervioso central. (Esquema tomado de la ref. 43).



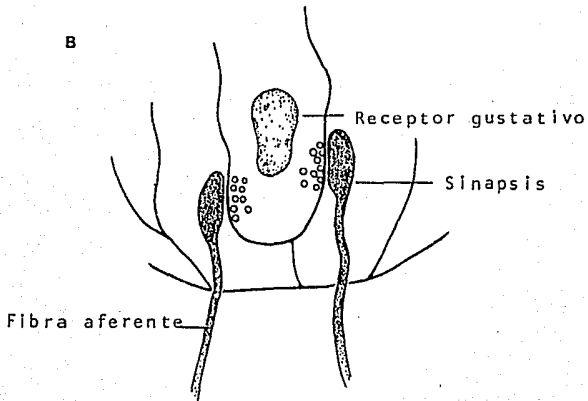
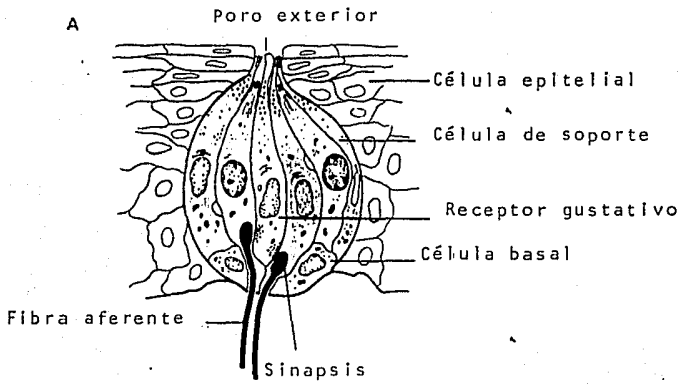
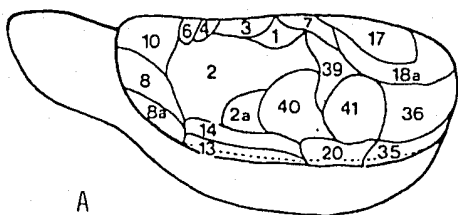
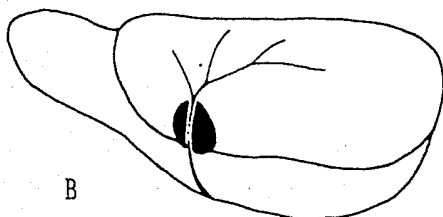
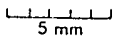


FIGURA 4

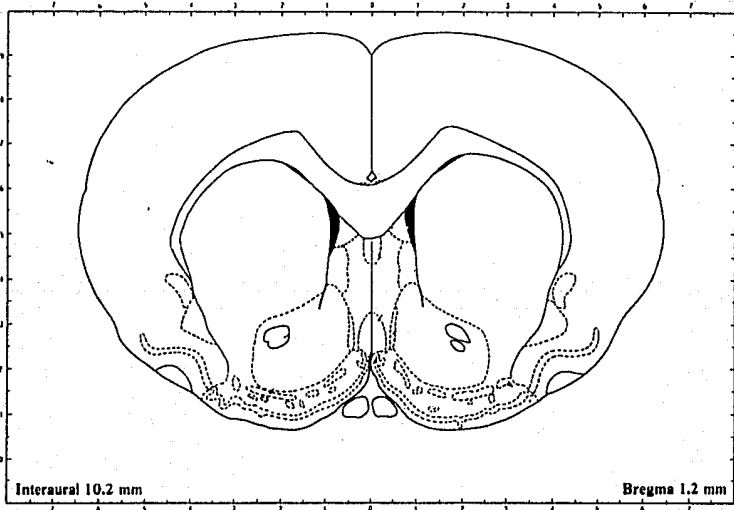
Fig 5.- LOCALIZACION DE LA NEOCORTEZA GUSTATIVA EN EL CEREBRO DE LA RATA. La neocorteza gustativa corresponde a las regiones 13 y 14 de la neocorteza lateral de la rata de acuerdo al criterio de Krieg (A). Se encuentra ubicada en la corteza temporal sobre el surco rinal a ambos lados de la arteria cerebral media (B). (C) Corte coronal del cerebro anterior sobre el plano donde se ubica la neocorteza gustativa.



A



B



C

FIGURA 5

Fig. 4. - PRINCIPALES CÉLULAS DE LA VÍA GUSTATIVA A LOS LARGO DEL NEUROEJE QUE SE HAN IDENTIFICADO COMO POSIBLES SUBSTRATOS DEL CAS. Abreviaturas empleadas: NIG, núcleo del tracto solitario; APG, área postinsular del gusto; VPM, núcleo ventropostalamedial talámico; AMY, amígdala; MD, neocórtex gustativo.

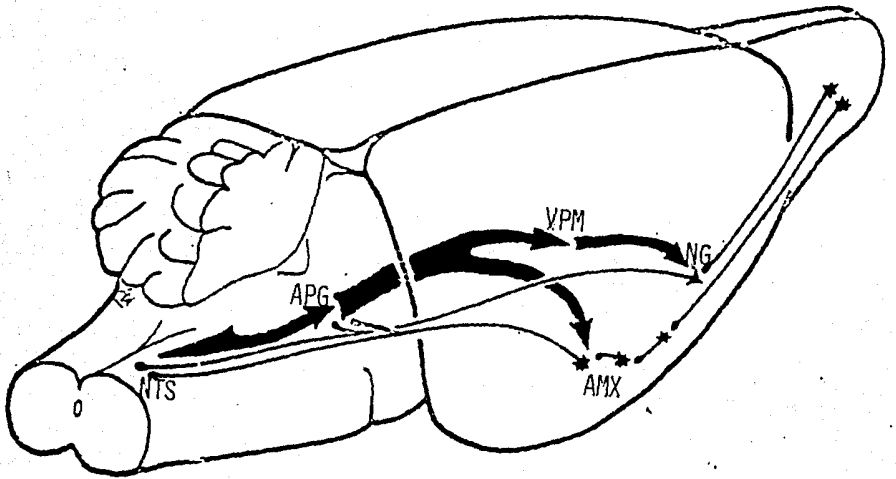


FIGURA 6

## Reconstrucción del CNS lesionado con homocélulas

Como se mencionó en la sección anterior, la NG puede ser un sustrato adecuado para la adquisición del CNS pues su destrucción impide la reconstrucción del aprendizaje, es decir, las ratas no presentan dificultad en aprender que les ha producido maltrato físico (Fig. 7). En 1967, Federico Hernandez y cols. (53) demostraron que trasplantes de HB fetal al cerebro de ratas adultas previamente lesionadas (trasplantes homotópicos) inducían recuperación de la conducta sólo semanas después de la cirugía (Fig. 7). Este proceso de recuperación no fue espontáneo, ya que animales que no recibieron trasplante alguno (controles temporales) o aquellos que recibieron tejido distinto a la NG (trasplantes heterotópicos) no mostraron reversión.

De esta manera, las deficiencias de el aprendizaje del CNS producidas con lesiones de la NG pueden revertirse con el empleo de trasplantes de tejido cerebral y parece existir cierta especificidad respecto al tejido que va a ser trasplantado. ¿CÓMO es el mecanismo responsable de la recuperación observada? Un segundo estudio del mismo grupo (54) reveló que el trasplante homotópico podía establecer conexiones con su huésped de un modo muy similar al observado en animales intactos. Es decir, el injerto permeabiliza de nuevo un trasdador retrogrado de vías neuronales. En la muestra de animales trasplantados en la NG con tejido homotópico fetal, los autores encontraron cuerpos neuronales marcados en el trasplante, a diferencia de lo que se obtiene al trabajar con ratas trasplantadas heterotópicamente. En este último caso, el trasplante no se integró con el huésped

y no fue posible detectar ninguna actividad después de la injcción de la parafina. Este resultado demuestra que el implante de tejido conectival habilitaría proyecta sus fibras dentro del parénquima del hipocámpo hacia blancos con los que el tejido original mantenía contactos previos.

Existe en la literatura una serie de reportes en los que se ha encontrado que el restablecimiento de conexiones entre el trasplante y el hipocámpo puede ser el responsable de fenómenos de recuperación conductual. Por ejemplo, Borkland y cols. (19) han demostrado el restablecimiento de conexiones al hipocampo después de la implantación de septas subiculares. En estos experimentos, la actividad de la enzima colina acetiltransferasa (encargada de la síntesis de acetilcolina) presente en el hipocampo era comparable a la que existe normalmente en esta región y muy superior a la observada en animales denervados (24). De este modo, puede pensarse que los trasplantes a la NG que ocasionan restablecimiento del aprendizaje se comportan de un modo similar al tejido intacto desde un punto de vista bioquímico.

Antes de abordar el problema específico de los neurotransmisores en la NG y el papel potencial que pueden jugar en el proceso de recuperación, en la siguiente sección se presenta un panorama general sobre los neurotransmisores existentes en la corteza cerebral y los distintos papeles que juegan en dicha estructura.

Fig 7- RECUPERACION DEL CAS INDUCIDA POR TRANSPLANTES DE CORTEZA FETAL. Un grupo de ratas intactas (CON) y tres lesionadas en la neocórtex (grupos LESN, SEN y SEI), fueron entrenados en un modelo experimental de aversión al gusto. Los animales lesionados fueron incapaces de asociar el sabor de una solución de sacarina con la irritación gástrica inducida por la administración de LiCl a diferencia de los controles, lo que se refleja en una disminución en el consumo del líquido por parte de estos últimos (Figura 8, PCC). Tiempo total de 17 días de gestación fue implantado en uno de los tres grupos lesionados. El grupo SEN recibió neocórtex agénico fetal, tal como se describe en el grupo SI recibió tactus fetal. El grupo LESN permaneció sin implante. Catorce semanas después se verificó a todos los animales y se observó que sólo aquellos que recibieron neocórtex fetal fueron capaces de adquirir aversión al gusto en grado comparable a la presentada por los controles (de arriba, PCC). Los datos se expresan como porcentaje de líquido consumido con respecto a la línea basal de ingestión. (Tomado de la ref. 22).



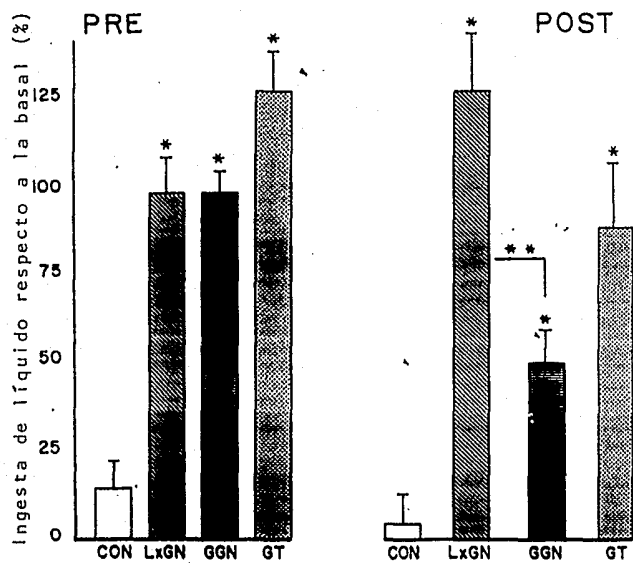


FIGURA 7

## NEUROTRANSMISORES EN LA CORTEZA CEREBRAL

El estudio de los neurotransmisores en la corteza cerebral se remonta a principios del siglo XX. Es, sin embargo, hasta épocas más recientes que se han logrado conocer los transmisores en esta región y se han establecido los circuitos neuronales que manejan las diferentes moléculas mensajeras.

El papel del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como el principal neurotransmisor inhibitorio en la corteza ha sido ampliamente documentado, usando distintas técnicas experimentales: identificación inmunohistoquímica de neuronas y fibras GABAérgicas en la corteza, inhibición de neuronas corticales tras aplicación exógena de GABA, liberación de GABA tras despolarización de neuronas de la corteza, aumento en la conductancia del cloro tras administración de GABA y otras (55).

La mayoría de los circuitos GABAérgicos existentes en la corteza parecen ser locales y la morfología y la sinaptología de las terminales GABAérgicas corticales son conocidas con gran detalle (56).

La importancia de la acetilcolina como neurotransmisor en la corteza se estableció cuando se encontró que una de las principales alteraciones neuroquímicas observadas en pacientes con enfermedad de Alzheimer era la carencia de las enzimas de síntesis y de degradación de dicho transmisor (55). Por otro lado, se ha sugerido que la acetilcolina está involucrada en procesos de aprendizaje y memoria (57), lo que explica parcialmente la marcada alteración de la memoria que sufren dichos pacientes.

Estudios inmunocitoquímicos y autorradiográficos han mostrado la existencia de fibras colinérgicas y la presencia de receptores muscarínicos en varios niveles de neurotransmisores principales en las vías corticofugales. Experimentos de liberación de glutamato exógeno en áreas del cerebro que reciben inervación cortical (el hipocampo, por ejemplo) han revelado la existencia de mecanismos de captura y de liberación del aminoácido, siendo este último, dependiente de calcio (55). Por el contrario, son muy escasos los reportes en los que se encuentren fibras glutamatérgicas aferentes a la corteza. Experimentos de liberación de glutamato exógeno en áreas del cerebro que reciben inervación cortical (el hipocampo, por ejemplo) han revelado la existencia de mecanismos de captura y de liberación del aminoácido, siendo este último, dependiente de calcio (55). Por el contrario, son muy escasos los reportes en los que se encuentren fibras glutamatérgicas aferentes a la corteza. Por ejemplo, lesiones del bulbo olfatorio producen una reducción marcada de los niveles de glutamato en la corteza olfatoria y estimulación del tracto olfatorio lateral produce liberación de este aminoácido en la misma región de la corteza (59).

## OBJETIVOS

La existencia de conexiones neurales entre transparente y huésped sugieren que el establecimiento de la neurotransmisión en la NB puede estar involucrado en el fenómeno de recuperación conductual observada. El objetivo del presente trabajo es demostrar que el tejido cerebral fetal transplantado a animales lesionados en la NB posee las mismas propiedades bioquímicas que el tejido intacto. Debido a que no existen reportes en los que se haya caracterizado neuroquímicamente a la NB, se tratará de establecer si la NB de animales intactos es capaz de liberar acetilcolina, GABA, dopamina y ácido glutámico así como demostrar que posee actividad de las enzimas glutamato dehidrogenasa, colina acetiltransferasa y acetilcolinesterasa.

De igual forma, se pretende averiguar si existe algún parámetro bioquímico que permita diferenciar entre el tejido que favorece la recuperación y el que no tiene efecto. En otras palabras, se desea conocer si existen diferencias bioquímicas entre el tejido homotípico y el heterotípico que expliquen la imposibilidad de éste para inducir recuperación conductual.

## RESULTADOS

La prueba experimental del presente trabajo se divide en dos partes: en la primera, se trata de caracterizar a la AS desde un punto de vista histológico, empleando técnicas de liberación de neurotrofoquinas solubles y de determinación de actividades enzimáticas.

En la segunda parte, trabajando con trasplantes homogéneos y heterotópicos y empleando las mismas técnicas inmunológicas, se pretende encontrar alguna diferencia entre ambos tejidos que permita explicar el fenómeno de respuesta inmune diferencial del SAS.

La metodología empleada y los resultados obtenidos se presentarán a continuación en forma de dos artículos que serán enviados para su publicación en la revista *Neurociencia*.

TRABAJO 1

NEUROTRANSMITTERS OF THE GUSTATORY NEOCORTEX: SYNTHESIS AND  
RELEASE OF ACETYLCHOLINE, GABA, DOPAMINE AND GLUTAMIC ACID

NEUROTRANSMITTERS OF THE GUSTATORY NEOCORTEX: SYNTHESIS AND  
RELEASE OF ACETYLCHOLINE, GABA, DOPAMINE AND GLUTAMIC ACID

Juan Carlos López-García, Federico Bermúdez-Rattoni and  
Ricardo Tapia

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

Running title: Neurotransmitters in the gustatory neocortex

Correspondence should be sent to:

Ricardo Tapia M.D. Ph. D.

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

Apartado Postal 70-600

04510 México D.F., México

Tel. (905) 550-5215 x 4935

## ABSTRACT

The gustatory neocortex, final relay along the gustatory pathway, is a portion of the brain involved in the neural integration of feeding behavior. Since information on the neurotransmitters in this nucleus is scarce, the aim of the present work was to establish whether acetylcholine, GABA, dopamine and glutamate may act as transmitters within this structure. It was found that gustatory neocortex slices are able to release exogenous GABA, acetylcholine and glutamic acid but not dopamine. On the other hand it was possible to detect significant glutamic acid decarboxylase, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in BN homogenates. The activity of the two enzymes involved in acetylcholine metabolism was higher than those observed in other cortical regions. These findings suggest that GABA, acetylcholine and glutamate probably are neurotransmitters in the gustatory neocortex whereas DA is not.



The flow of gustatory information along the central nervous system of the rat has been tracked with the use of neuroanatomical, electrophysiological and behavioral methods and several brain nuclei have been implicated in the neural integration of feeding behavior (7,8). For example, neurons within the central third of the nucleus of the solitary tract respond to both gustatory and visceral stimuli (2,10). These neurons send ipsilateral projections to a structure known as the parabrachial nucleus of the midbrain (16,20). Fibers from this nucleus are received by cells in the posterior ventromedial nucleus of the thalamus (7) which in turn send their axons to a region of the temporal cortex on the middle cerebral artery above the rhinal nucleus named gustatory neocortex (GN) (3). Although there is a great deal of information regarding the neuronal circuitry and physiology of the gustatory pathway (3,11,12,14,21), neurochemical information on the transmitters present at the different relays is scarce. In this work, we determined whether GN is able to release and synthesize acetylcholine (ACh), 5-hydroxytryptamine (5HT), L-glutamate (Glu) and dopamine using conventional neurochemical methods in an attempt to establish their possible role as neurotransmitters in this structure.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

Adult male Fisher rats (200-250 g) were used in all the experiments. All animals were sacrificed by decapitation and their brains quickly removed. GM was carefully dissected on ice and sliced or homogenized as required.

### Release of labeled neurotransmitters

For release experiments, a previously described superfusion method was used (15). GM slices (200  $\mu$ m thickness, 10 mg) were obtained in a Millikin tissue chopper. Slices were preincubated 10 min at 37°C in 1 ml of oxygenated medium containing: NaCl (118 mM), KCl (4.7 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2 mM), CaCl<sub>2</sub> (2.5 mM), MgSO<sub>4</sub> (1.2 mM), glucose (5.5 mM) and Tris-HCl (20 mM, pH 7.4). After this period, one of these combinations of labeled molecules was added to the incubation volume in order to load the slices: [methyl-<sup>3</sup>H]dihydrochloride (2  $\mu$ Ci, 0.5  $\mu$ M final concentration) plus [11C(+)CGP845 (2  $\mu$ Ci, 0.5  $\mu$ M final concentration), or [3H]dopamine (2  $\mu$ Ci, 20  $\mu$ M final concentration) plus [1-<sup>14</sup>C]guanine (0.5  $\mu$ Ci, 0.5  $\mu$ M final concentration). After another 10 min period of incubation, 0.2 ml aliquots were transferred to superfusion chambers holding 0.45 cm filters. Tissue was washed by superfusion at 1.5 ml/min during 5 min and then at 0.5 ml/min (low speed) for the collection of four fractions. Superfusion medium was the same as the one used during incubation. After 5 min of superfusion at low speed, medium in the chamber was quickly substituted by one containing a depolarizing KCl

concentration (400  $\mu$ M) and ten more fractions were collected. In experiments designed to evaluate Ca<sup>2+</sup> dependence of the release, EGTA was omitted from both media and 0.3 mM EGTA was added in order to chelate any remaining Ca<sup>2+</sup>. In experiments with GABA, the media contained 0.1 mM malonic acid, in those with choline 0.1 mM aspartic acid and in those with dopamine 0.1 mM pargyline and 1  $\mu$ M ascorbic acid. The radioactivity in each collected fraction and that remaining in the filter was counted by scintillation spectrometry after the addition of 0.5 ml of Tritonol (6). Every collected fraction contained two different labeled compounds. Under our experimental conditions, we found that about one third of the radioactivity, counted in the 1401 channel, was also detected in the 1311 channel. This value was used to correct the obtained results, in order to find the actual amount of the <sup>3</sup>H-labeled compound present in every sample. Results are expressed as percent of total radioactivity released per minute. Total radioactivity is defined as the sum of total released radioactivity plus that remaining in the filter at the end of the superfusion.

#### Separation of labeled choline from acetylcholine released

In some experiments of release after loading the BM slices with [<sup>3</sup>H]choline, we determined the proportion of labeled choline and ACh released. For this purpose, labeled choline was phosphorylated with choline kinase and subsequently, the newly synthesized [<sup>3</sup>H]ACh was extracted into a toluene scintillation mixture, as previously described (10). Under our experimental

condition, about 90-95% of the total choline present was phosphorylated and the actual value in each experiment was used to correct the results obtained.

#### Glutamic acid decarboxylase (GAD) assay

GAD activity was measured in homogenates of SN and frontal and occipital cortices according to the method described by Olsberg and Brady (11). SN was homogenized in acid water and aliquots from the homogenate were incubated in a final volume of 70  $\mu$ l of a mixture containing: D-threo-glucose (10 mM, 0.700 mM), dithiothreitol (1.17 mM) and NaHCO<sub>3</sub> buffer (50 mM, pH 6.5) in the presence or absence of 0.5 mM pyridoxal-5'-phosphate (PLP) as required. After a 20-min period of incubation at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 0.5 ml HClO<sub>4</sub> (4.5 M). Incubation was continued for one hour to allow trapping of the released <sup>14</sup>C-PLP-CO<sub>2</sub> (pyridoxal hydrochloride). Radioactivity was counted by scintillation spectrometry, after the addition of 10 ml scintillation mixture (3 g 1,4-diphenylpicrylhydrazole and 100 mg 1,4-bis(2-(5-phenyloxazolyl))2 benzene in 1 l toluene).

#### Choline acetyltransferase (ChAT) assay

ChAT activity was measured according to the method described by Fonnum (8), slightly modified. Water homogenized of SN and frontal and occipital cortices from intact animals were incubated in a final volume of 700  $\mu$ l of a mixture containing:

NaCl (700 mM), HEPES buffer (41 mM, pH 7.0), eserine sulphate (0.1 mM), EDTA (10 mM), sodium chloride (10 mM), Carbaryl-THiocytl-DNA (100 nM), 0.2 mM and Trislow X-100 (0.05%). Samples were incubated at 37°C for 15 minutes. At the end of the incubation period, the incubation mixture was washed out with 5 ml of 10 mM sodium phosphate buffer and 2 ml of acetonitrile containing 10 mg of sodium tetraphenylborate were added. After the addition of 10 ml of scintillation mixture, newly synthesized CH3ACH is detected in a scintillation spectrometer.

#### Acetylcholinesterase (AChE) assay

AChE activity was determined in splar homogenates of CH and frontal and occipital cortices according to a spectrophotometric method previously described (1). Tissues was placed into a cuvette in the presence of 500  $\mu$ M diethylenetriamine and 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8. The reaction was started with the addition of 0.5 mM acetylthiocholine iodide (final concentration) and followed at 412 nm in a Beckman spectrophotometer.

Protein was determined according to the method of Lowry et al. (12).

## RESULTS

### Release experiments

Labeled GABA and ACh release from SN slices in response to high potassium concentrations is shown in Fig. 1. Depolarization, in the presence of  $Ca^{2+}$  ions, produced a 3-fold increase in the release of  $[^3H]GABA$ . Peak stimulation was reached two or three min after changing the medium. This release was only partially  $Ca^{2+}$ -dependent, since the absence of this cation from the superfusion media reduced the stimulated  $[^3H]GABA$  efflux by about 40%.

When SN slices were incubated with  $[^3H]ACh$  and depolarized in the presence of  $Ca^{2+}$  ions, a two-fold increase in the release of radioactivity was observed at the stimulation peak (two minutes after changing the medium). This release was completely  $Ca^{2+}$ -dependent, since no stimulation was observed when this cation was absent from the media (Fig. 1).

The strict  $Ca^{2+}$ -dependence of stimulated release strongly suggests that the radioactive molecule released is ACh. This was confirmed in the experiments in which the released labeled choline and ACh were separated, since only the latter was stimulated by depolarization (Table 1).

Figure 2 shows  $[^3H]Gly$  release from SN slices. A 3.5-fold increase in release was found after stimulation with high  $K^+$  concentrations. The peak of stimulation was reached four minutes after changing the medium and, as in the case of GABA, omission

of  $Ca^{2+}$  from the nuclei resulted in a considerable (50%), but not complete, inhibition of stimulation.

As also shown in Fig. 2, GN slices were not able to release significant amounts of GABA in response to K<sup>+</sup>-depolarization.

### Glutamate decarboxylase

As shown in Table 2, GN has similar GAD activity, as compared to other cortical areas, both in the absence and in the presence of PUF. Addition of PUF to the incubation chamber enhanced GAD activity in GN homogenates by 25%. Similar values were obtained in frontal and occipital cortices.

### Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase

Table 3 shows the activity of the two main enzymes involved in the biosynthetic and degradative pathways of ACh in the GN. GN has considerable AChE and ChAT activities. AChE activity was significantly higher than that observed in the other cortical regions studied ( $p < 0.01$ ), whereas ChAT activity, albeit higher, did not reach statistical levels of significance ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

The identity of the neurotransmitters in the GN is unknown. The results of the present work provide some information regarding the possibility that acetylcholine, GABA, dopamine and glutamic acid may play a part in the GN.

### GABA

The role of GABA as the main inhibitory neurotransmitter in the brain, particularly in the cortex, has been widely documented using several experimental approaches: immunocytochemical identification of GABA neurons and fibres within the cortex, inhibition of cortical neurons after application of GABA, release of GABA from the cortex following depolarization, enhancement of Cl<sup>-</sup> conductance following GABA administration and many other (2,10).

Our present findings fully agree with the present view and indicate that there does seem to be no difference between GN and other cortical regions. GN is able to release GABA in response to depolarization, to an extent comparable to that observed in other regions of the cortex (occipital and frontal; see Table 1). This release is partially Ca<sup>2+</sup>-dependent. Moreover, significant GAD activity was found in the GN and, again, there were no differences among the cortical regions studied.

The main projection received by GN comes from the thalamus. It has been shown, by means of histochemical detection, that axons arising from its ventroposteromedial nucleus and arriving



to SN contain 313-cysteine (14). Several examples are known of coexistence of this nucleide with GABA. Hence, it is possible to suggest that the latter is a neurotransmitter within the SN.

### Acetylcholine

ACh is also synthesized and released from SN slices. Our results show that SN homogenates possess considerable amounts of the enzymes ChAT and AChE and that their activity is higher than that observed in other cortical regions. Moreover, we observed that the former enzyme is functional in the slices, since labeled ACh newly synthesized from 125I-choline was released after depolarization. Since this release was Ca<sup>2+</sup> dependent, this result indicated that ACh is most probably a neurotransmitter in the SN.

Immunocytochemical and autoradiographic studies (21) have shown the existence of ChAT and AChE fibers and the presence of muscarinic receptors at several levels within the cerebral cortex. The nucleus basal, from which fibers originate in SN, is not known although it has been suggested that the major cholinergic structure projecting throughout the whole cortex is the nucleus basalis mesencephalicus. Recently, it has been suggested that this nucleus sends fibers to the SN (17).

### Dopamine

The functions of dopamine in the cerebral cortex are not

very clear. Our findings suggest that dopamine and related catecholamines do not play an important role as "classical" neurotransmitters in this structure but that they may act as modulators of synaptic transmission through a hitherto unknown mechanism (10). Our findings show that GN is not able to release dopamine after depolarization of the cell even when they seem to take up the dopamine. Furthermore, attempts to localize its synthesizing enzyme (dopamine hydroxylase) in fibers or in somata within the GN have proven to be unsuccessful (14). Taken together, these data argue against a role of dopamine as neurotransmitter in the GN.

#### Glutamic acid

Several lines of evidence tend to suggest that glu is the most widely used excitatory neurotransmitter in the whole brain. Uptake studies have shown the existence of glu fibers in several brain regions and it is generally accepted that most corticofugal fibers are glutamatergic (17). On the other hand, information on afferent glutamatergic fibers in the cortex is scarce. For example, lesions of the olfactory bulb cause a marked reduction in endogenous glu levels of the olfactory cortex and stimulation of the lateral olfactory tract elicits glu release in the olfactory cortex.

We have observed that GN takes up exogenous glu and releases it in a partially Ca<sup>2+</sup>-dependent fashion. Thus, the possibility that glu plays a role as a neurotransmitter in the GN cannot be discarded. On the other hand, preliminary observations from our

laboratory indicates that thalamic lesions, which reduce afferent fibers to the SN, reduce endogenous glutamate in the latter. Although we are not certain whether this reduction affects releasable pools of the neurotransmitter, it has been proposed that certain afferent thalamic fibers originating in the thalamus may be glutatergic.

In conclusion, the present findings indicate that SN is able to take up and release glc, ACh and GABA besides displaying GAD, ChAT and AChE activities and therefore that these compounds may have a neurotransmitter role in the SN. In contrast, DA does not seem to play such a role in this structure.

## REFERENCES

1. - Albers, R. M. and Brady, R. B. (1957) The distribution of glutamic acid decarboxylase in the nervous system of the rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* 231, 726-728.
2. - Axtell, M. E. (1953) On the central course of afferent fibers in the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagal nerves and their nuclei in the mouse. *Acta Physiol. Scand.* (Suppl. 106) 27, 309-320.
3. - Braun, J. V., Ladder, F. B. and Dieter, G. W. (1982) The gustatory neocortex of the rat. *Physiol. Psychol.* 10, 13-45.
4. - Ellman, G. L., Courtney, D. K., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
5. - Fearn, F. (1975) A rapid radiochemical method for the determination of cholinergic acetyltransferase. *J. Neurochem.* 24, 407-409.
6. - Fricks, G. (1975) Tritosol: a new scintillation cocktail based on T. 110. *X 100. Anal. Biochem.* 63, 555-558.
7. - Fukuhashi, T. and Kerr, W. L. (1979) Organization of trigeminothalamic tracts and other thalamic afferent systems of the brainstem in the rat: Presence of painless neurons with thalamic connections. *J. Comp. Neurol.* 183, 165-184.
8. - Houser, C. R., Vaughn, J. E., Hendry, S. H. C., Jones, E. J. and Peters, A. (1984) GABA neurons in the cerebral cortex. In: *Cerebral cortex, Volume 2. Functional properties of cortical cells.* (Eds. Jones, E. G. and Peters, A.), pp. 63-89. Plenum Press, New York.

- 9.- Kiefer, S. W. (1988) Neural mediation of conditioned food aversions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 443, 109-109.
- 10.- Kraljic, K. (1984) Neurotransmitters in cerebral cortex: a general account. In: *Cerebral cortex, Volume 2, Functional properties of cortical cells*. (Eds. Jones, E. G. and Mountz, A.), pp. 38-61. Plenum Press, New York.
- 11.- Lasiter, P. G. (1982) Cortical substrates of taste aversion learning: direct amygdalocortical projections to the gustatory neocortex do not mediate taste aversion learning. *Physiol. Psychol.* 10, 377-393.
- 12.- Lasiter, P. G. And Glanville, D. L. (1983) Cortical substrates of taste aversion learning: involvement of the dorsolateral amygdaloid nuclei and temporal neocortex in taste aversion learning. *Behav. Neurosci.* 79, 287-296.
- 13.- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 14.- Meeley, R. M. and Haub, S. P. (1984) Neuropeptides are present in projection neurons at all levels in visceral and taste pathways: from periphery to sensory cortex. *Brain Res.* 299, 297-311.
- 15.- Morales, I. and Tavis, R. (1987) Neurotransmitter of the cerebellar glomeruli: uptake and release of labeled  $\gamma$ -aminobutyric acid, glycine, serotonia and choline in a purified glomerulus fraction and in granular layer slices. *Brain Res.* 420, 11-21.
- 16.- Schwarzhäus, J. C. (1987) Electrophysiology of taste-

modified functions in parabrachial nuclei of behaving rabbit.  
Brain Res. Bull. 11, 88-92.

17. - Oliva, R., Biale, L. and Amadeo, A. (1983) Candidates for synthesis of the cerebral insulin. In Cerebral cortex. Volume 2. Functional properties of cortical cells. (Eds. Jones, E. G. and Peters, A.), pp. 119-133. Plenum Press, New York.

18. - Topik, R., Sitano, M. and Ibrahim, B. (1983) Regulation of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4 $\alpha$ -aminopyridine in synaptosomes. Brain Res. Bull. 17, 373-381.

19. - Tardif, D., Keenan, S. P. and Brown, R. F. (1983) Nucleus basalis: Neurochemicals is involved in taste aversion learning in rats. Soc. Neurosci. Abstr. 10, 122A.

20. - Travenca, J. B., Travenca, S.M. and Margenau, A. (1987) Gustatory neural processing in the brainstem. Ann. Rev. Neurosci. 10, 595-632.

21. - Mansley, E. M. (1981) Autoradiographic localization of receptor sites in the cerebral cortex. In: Cerebral cortex. Volume 2. Functional properties of cortical cells. (Eds. Jones, E. G. and Peters, A.), pp. 173-202. Plenum Press, New York.

22. - Yamashita, T. / Mizumura, Y. (1977) Physiological characteristics of cortical taste areas. In Satiety and Taste VI (eds. Le Magnen, J. and Marléac, P.), pp. 207-253. Information Retrieval, London.

#### FIGURE LEGEND:

Figure 1. - Release of labeled GABA (left panel) and ACh (right panel) from BM slices in the presence and absence of  $Ca^{2+}$ . After loading the slices with both substances, they were superfused as described in Experimental procedures. At 6 min the superfusion medium was changed for one containing 47 mM KCl. Mean values of 10 experiments. The maximum S.E.M. was 20% of the corresponding mean but for most points it was smaller than 10%.

Figure 2. - Release of labeled glutamic acid and dopamine from BM slices. Details as for Fig. 1. Mean values of 6 experiments. The maximum S.E.M. was 21% of the corresponding mean, but for most points it was smaller than 10%.

FIGURE 1

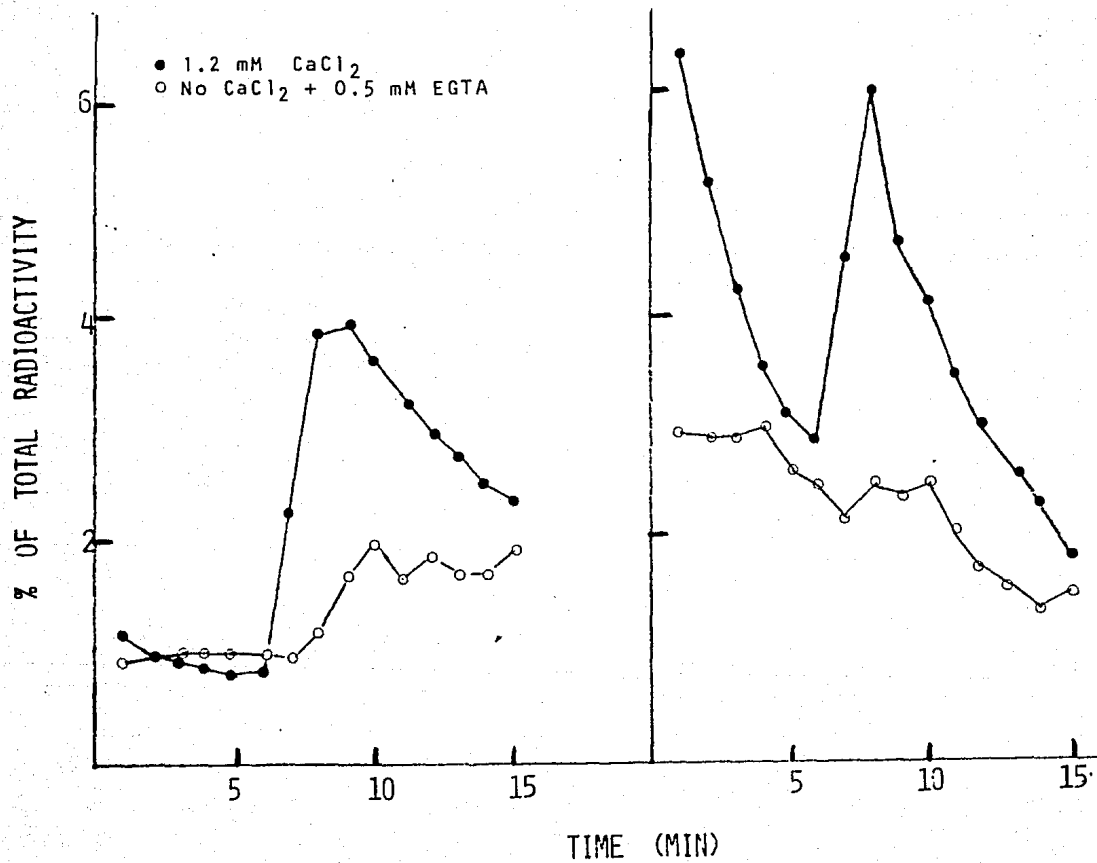




FIGURE 2

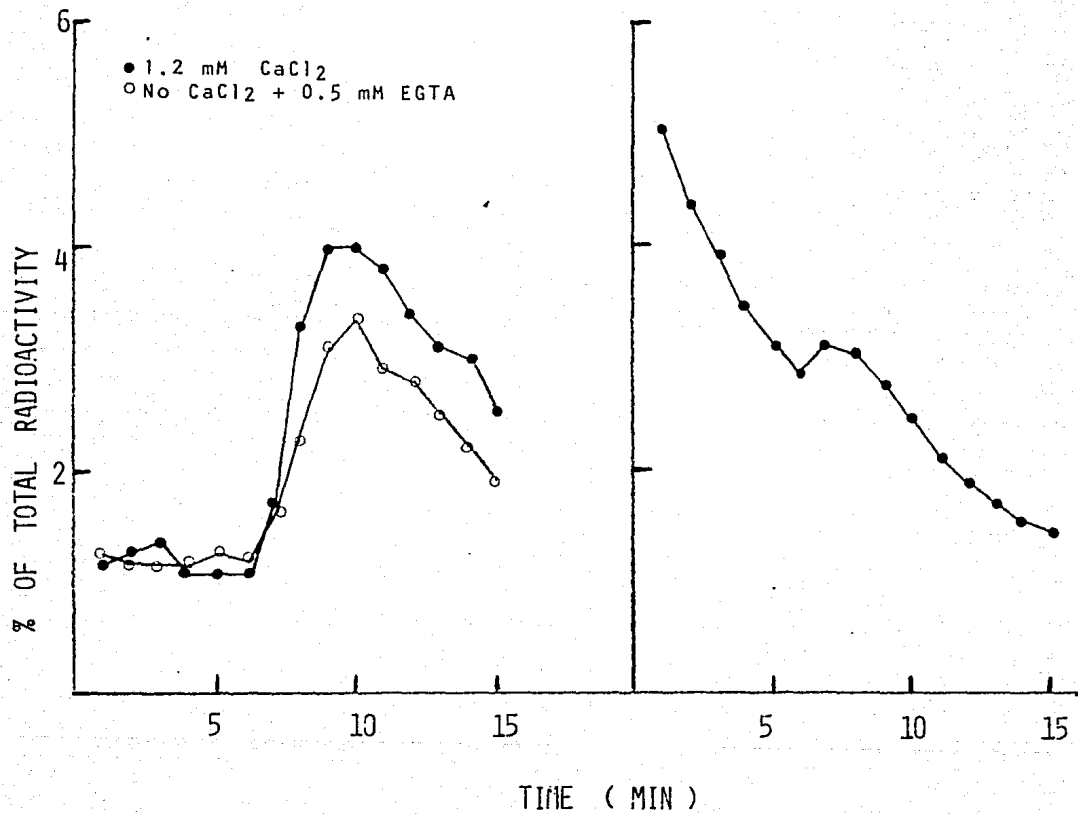


TABLE 1. EFFECT OF K<sup>+</sup>-DEPOLARIZATION ON (<sup>3</sup>H)CHOLINE AND (<sup>3</sup>H)ACh RELEASE

	4.7 mM KCL	47 mM KCL	% STIMULATION
( <sup>3</sup> H)CHOLINE	418 ± 94	232 ± 47	0
( <sup>3</sup> H)ACh	1163 ± 205	1954 ± 440	70

DATA ARE EXPRESSED AS DPM ± S.E.M. SUPERFUSION FRACTIONS FROM MIN 2, 3 AND 4 (LOW KCL MEDIUM) AND FROM MIN 7, 8 AND 9 (HIGH KCL MEDIUM) WERE MIXED AND LABELED COMPOUNDS WERE SEPARATED AS INDICATED IN EXPERIMENTAL PROCEDURES (N = 4).

TABLE 2. GAD ACTIVITY IN RAT CORTEX HOMOGENATES

GAD ACTIVITY (UMOL/H/100 MG PROT.)			
	+PLP	-PLP	N
FRONTAL	5.8±0.7	3.5±0.3	8
GUSTATORY	4.6±0.3 *	3.2±0.3	18
OCCIPITAL	6.0±0.6	3.8±0.4	8

DATA ARE EXPRESSED AS MEAN ±S.E.M.

\* = SIGNIFICATIVELY DIFFERENT FROM OCCIPITAL  
CORTEX (P<0.02, STUDENT'S T-TEST)

TABLE 3. CHAT AND AChE ACTIVITIES IN RAT CORTEX HOMOGENATES

	CHAT (NMOL/H/MG)	N	AChE (NMOL/MIN/MG)	N
FRONTAL	48.2 ± 6.6	12	37.6 ± 1.4	16
GUSTATORY	79.4 ± 8.4	12	58.7 ± 5.3 *	28
OCCIPITAL	55.8 ± 8.7	10	31.8 ± 1.0	12

DATA ARE EXPRESSED AS MEAN ± S.E.M.

\* = SIGNIFICATIVELY DIFFERENT FROM FRONTAL AND OCCIPITAL  
CORTICES (P<0.01, STUDENT'S T-TEST).

TRABAJO 2

CORRELATION BETWEEN ACETYLCHOLINE RELEASE AND CONDITIONED TASTE  
AVERSION RECOVERY INDUCED BY FETAL NEOCORTEX GRAFTS

CORRELATION BETWEEN ACETYLCHOLINE RELEASE AND CONDITIONED TASTE  
AVERSION RECOVERY INDUCED BY FETAL NEOCORTEX GRAFTS

Juan Carlos López-García, Juan Fernández, Federico Bermúdez-  
Rattoni and Ricardo Tapia

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

Running title: Acetylcholine release and taste aversion recovery

Correspondence should be sent to:

Ricardo Tapia M.D. Ph. D.

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

Apartado Postal 70-600

04510 México D.F., México

Tel. (905) 550-5215 x 4935

## ABSTRACT

Rats with lesions of the gustatory neocortex show deficits in the acquisition and retention of conditioned taste aversions. It has been shown that fetal gustatory neocortical transplants restore taste aversion learning and establish connections with its host tissue. In this work we examined whether the grafts are functional from a biochemical point of view and whether this fact can be related to behavioral recovery. One group of gustatory neocortex-lesioned rats was tested for taste aversion learning. Gustatory and occipital cortices (homotopic and heterotopic grafts, respectively) were dissociated from rat fetuses and implanted into the lesion cavity. Two months later, the animals were retrained and the degree of recovery was tested. The grafts were carefully dissected out and the release of labeled GABA, acetylcholine, dopamine and glutamic acid from the sliced grafted tissue was assayed. We found that homotopic grafts promoted recovery of learning and were capable of releasing GABA, acetylcholine and glutamate in response to K<sup>+</sup>-depolarisation similarly to control tissue. Heterotopic transplants, which did not induce recovery, released GABA but not acetylcholine. Moreover, heterotopically-grafted animals in which recovery was not seen, did not release acetylcholine. These results are in agreement with our previous observations that cholinergic transmission is important in the gustatory neocortex and suggest that acetylcholine may play an important role in the graft-mediated behavioral recovery.

Fetal brain transplants have proved to be a very useful tool to study regeneration in the damaged central nervous system (2,5,7). It has been well established that grafts can survive in and establish connections with the host in a variety of experimental models (8,9,10,11). However, behavioral deficits generated after brain damage were ameliorated following transplantation of embryonic tissue (12,13).

Conditioned taste aversion (CTA) is a learning paradigm in which graft-mediated recovery has been observed (14). In this behavioral model, rats acquire aversion to a taste cue (conditioned stimulus) when it is followed by digestive malaise (2).

The anatomical substrates responsible for CTA learning have been well established (15). It has been shown that bilateral lesions of the gustatory nucleus (GN), a region of the temporal cortex in the rat, disrupt acquisition of the aversion in an experimental model of CTA (6,17). Previous studies from our group (1) have shown that these learning deficits were completely reversed when GN-lesioned adult rats received fetal cortical grafts. Furthermore, the transplants were able to establish connections with the thalamus and the amygdala of their host resembling those present in intact animals. Moreover, when transplanted tissue was heterotopic (i.e. distinct to fetal SN) animals did not show behavioral recovery nor grafts established synaptic contacts with their host (2).

We have also shown that adult SN was able to release significant amounts of radioactive L-glutamate, L-glutamic acid (GABA), acetylcholine (ACh) and L-glutamate (glu) after K<sup>+</sup>-depolarization



in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner (Rapoport-Garcia, et al. accompanying paper).

In the present work, we have measured the release of these three putative transmitters in homotopic and heterotopic grafts implanted in the lesioned SN and attempted to correlate this release with the recovery of CTA.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Surgical procedures

Under deep pentobarbital anesthesia (100 mg/kg), male Wistar rats (200-250 g) were subjected to stereotaxic surgery in order to accomplish bilateral lesions of the CN, using the following set of coordinates with respect to bregma: AP 4.2, L ±5.5, V -8. Lesions were carried out by passing a 2 mA anodal current during 60 s through a monopolar stainless steel electrode. Following postoperative recovery, all animals underwent behavioral training (see below) after which they were randomly separated into two groups: animals which received fetal CN grafts (homotopic) and animals which received fetal occipital cortex grafts (heterotopic). Fetal brain grafts were performed as follows: seven postnatal old fetuses were removed from the abdominal cavity of pregnant rats under pentobarbital anesthesia and their brains were carefully extracted. Solid tissue blocks about 3 mm<sup>3</sup> volume were dissected from the rostral and depending on the target occipital area (above the striae callosae) and from the occipital cortex for homotopic and heterotopic grafts, respectively. With the aid of a 100 µl Hamilton syringe, blocks were placed stereotaxically into the cavity generated by the lesion using the same set of coordinates mentioned above. Eight weeks later, animals were trained again and the degree of behavioral recovery was determined according to the procedure detailed below.

## Behavioral procedure

Eight days after surgery, lesioned animals were deprived of water for 24 h and trained to drink water twice a day during ten min trials for five days. Once a consumption baseline was reached, water in the bottle was substituted with a 0.1 M LiCl solution in order to induce taste aversion. Baseline consumption was recorded for two more days and, in the third day, water was substituted with a 0.1 M NaCl solution in order to test taste aversion. LiCl and NaCl are indistinguishable by the rats on a taste basis. Animals which did not show aversion were discarded and the remaining ones were randomly assigned to groups as described above. The same training procedure was repeated eight weeks after grafting and recovery of learning was determined. A control group of intact animals was run in parallel with experimental animals from the beginning of the experiment.

## Release experiments

Release of labeled neurotransmitters was studied by a superfusion method previously described (accompanying paper, ref. 14). Animals from the three groups (i.e. intact, homotopic and heterotopic) were sacrificed by decapitation, their brains removed and CNV or transplant slices (200  $\mu$ m) were prepared on a McIlwain tissue chopper after careful dissection on ice of the proper region. Slices were incubated for 15 min in the presence of one of the following combinations of labeled compounds:

lactyl-<sup>14</sup>C]choline chloride (2  $\mu$ Ci, 0.5  $\mu$ M final concentration) or [<sup>14</sup>C]inositol (2  $\mu$ Ci, 0.5  $\mu$ M final concentration) or [<sup>3</sup>H]decanoic acid (2  $\mu$ Ci, 2  $\mu$ M final concentration) plus 11-<sup>14</sup>C]glu (0.5  $\mu$ Ci, 0.5  $\mu$ M final concentration). After washing of the organs radioactively by reperfusion, slices were superfused at low speed (0.5 ml/min) and the radioactivity in each of the 1 min collected fractions was determined by scintillation spectrometry after the addition of Tritonol.

## RESULTS

DONADO FOR L.C.S. - B.C.

### Behavioral observations

Postoperative training procedures revealed no significant differences between intact and lesioned animals on baseline liquid consumption and on the acquisition trial. Nonetheless, bilateral BN lesions caused significant loss of taste aversion learning as previously described ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1). Control animals showed strong NaCl consumption suppression on the test trial while both BN-lesioned groups of rats showed a significant increase in consumption when compared to previous day baseline intake or with the control group ( $p < 0.001$ ).

Nine weeks later (eight weeks after the transplants), when animals were retrained and recovery of learning was tested. Homotopically-grafted animals showed considerable recovery of CTR learning in full agreement with previous data and no significant differences were found between this group and control rats ( $p > 0.1$ ) (Fig. 1). On the other hand, animals which received heterotopic fetal tissue failed to acquire taste aversion, although a reduction of the NaCl consumption seen in lesioned animals was found in this group. However, this reduction did not reach statistical levels of significance ( $p > 0.05$ ).

### Release of labeled neurotransmitters from homo and heterotopic grafts

11403888A release stimulated by K<sup>+</sup>-depolarization from BN

slice is shown in Fig 2. In agreement with previous findings (Lopez-Barcia et al. accompanying paper), a 3 fold increase in GABA efflux was found at the peak of stimulation when compared with basal values. Maximal release was obtained within the first three minutes after depolarization and then a gradual decline of the release was observed in all cases.

Similar results were obtained with grafted tissue regardless of being homotopic or heterotopic (Fig 3) and no statistical differences were found among the groups.

Glutamate release is shown in fig 3. When compared with the last fraction of the baseline, 47mM K<sup>+</sup> induced a 3-fold increase in glu efflux from the control slices. The peak of stimulation was reached four minutes after depolarization. In the case of grafted tissue, a 4x-stimulation of the release was also observed. The peak of stimulation was also reached four minutes after changing the medium but in this case, stimulation was only two-fold as compared to baseline efflux.

On the other hand, GM can not bind to sites of Imidopamine. When slices were incubated in the presence of this neurotransmitter, no K<sup>+</sup>-induced release was seen in either tissue (i.e. intact and heterotopically-grafted, data not shown). We did not study GABAergic nor Imidopamine release in heterotopic grafts.

When ISH3ACH release was studied, significant differences were found among the groups. Fig 4 shows that, while intact SN and heterotopically-grafted tissue released similar amounts of the neurotransmitter following K<sup>+</sup> depolarization, heterotopic graft

slower failed to induce. Thus, to replicate 30 release 0.88M when incubated in the presence of both neurotransmitters.

Moreover, we found five subjects which, in spite of receiving fetal SN grafts, did not show behavioral improvements even though the transplants appeared well integrated and released GABA (Table 1). Interestingly, when [3H]ACh release was studied in these grafts, we found no correlation with depolarization.

Hence, the only difference between homotopic (which induce behavioral recovery) and heterotopic (which failed to induce behavioral recovery) grafts was the ability of the former to release ACh in a very similar way to that observed for controls.

Since this disparity could be merely attributed to the incapability of the occipital cortex to release [3H]ACh, we tested whether this was actually the case in a two fold manner: firstly, we studied the release of [3H]ACh from SN and occipital cortex in sixty days-old animals (the same age as that of the transplants when behavioral recovery is attained) and, secondly, we assayed [3H]ACh release in both SN and occipital cortex obtained from 17-20 day old rat fetuses.

When SN and occipital cortices from 30 days-old rats were incubated in the presence of [3H]ACholine and depolarized with 47mM K<sub>+</sub>, no differences were found between release patterns observed in both groups (fig. 5) and the amount of released radioactivity was similar to that obtained in adult tissue.

Furthermore, when [3H]ACh release was assayed in fetal tissue, both groups were unable to release detectable amounts of the labeled compound, albeit the radioactivity taken up was

similar to that observed in adult tissue for both regions (data not shown).



## DISCUSSION

In agreement with previous observations (1,8,19) the present results show that GN lesions disrupt CIA acquisition and GN-lesioned animals showed a certain preference for the salty solution in the test trials. Furthermore, fetal GN grafts were able to induce recovery of CIA learning in rats with previous GN ablations, whereas heterotopic grafts produced a slight improvement on learning deficits. The possibility of spontaneous recovery of learning can be ruled out, since previous studies have shown that GN lesions disrupt CIA learning even nine weeks after surgery.

Both homo and heterotopic grafts occupied completely the cavity generated by the lesion, whereas in nongrafted animals, the cavity remained visible even nine weeks after the surgery. We did not perform any histological examination in these experiments, but previous observations from our laboratory suggest that there is a great deal of viable cells within the grafts (8). Moreover, when dissection was carried out previous to tissue slicing, transplants looked well integrated with the host and, in some cases, it was difficult to differentiate between graft and host brain. This situation was more common with homotopic grafts. On the other hand, we have previously shown that tectal grafts to the lesioned GN do not induce behavioral improvement, do not integrate with the host brain and hardly increase in volume (8).

Several authors have reported specificity of the tissue to be transplanted in order to accomplish anatomical and functional

recuperation. For example, Stein and coworkers (17) grafted cerebellar tissue to the frontal lobe of lesioned animals and did not find recovery in a maze learning task.

The existence of such specificity is not surprising since different structures possess different cytoarchitectonic and diverse metabolic requirements. Hence, one might expect to find unequal degrees of recovery and integration of the transplant with the host brain, depending on the similarities between the grafted structure and the host region. Nonetheless, CTA improvement shows an exceptional degree of specificity, since occipital cortex grafts do not induce behavioral recuperation in spite of being well integrated with the host brain.

It is generally accepted that the whole cortex shows similar patterns of histological organization and, in a broad sense, exhibits a certain degree of homogeneity. Hence it was a somewhat unexpected finding that heterotopic grafts induced such a small behavioral recovery.

When transmitter release was assayed in the grafts, we found that both homotopic and heterotopic transplants released GABA as response to K<sup>+</sup> depolarization, whereas only the former released ACh. This suggests that there is a correlation between ACh release and behavioral recovery. This correlation is supported by the observation that CN-grafts which did not promote CTA recuperation also were unable to release ACh similarly to heterotopic grafts.

The differential induction of recovery by homotopic and heterotopic grafts cannot be attributed to an incapability of the

occipital cortex to take up and release ACh since two month-old infant occipital and SN tissue were capable of releasing ACh after depolarization in an identical way. Similarly, fetal SN and occipital cortex did not release ACh. Thus, both structures possess the same characteristics at the moment they are transplanted and follow the same pattern of development as in intact animals. Thus, host brain seems to specifically promote the appearance of ACh release mechanisms in SN fetal tissue but not in occipital cortex.

ACh seems to play a role in CTA learning since it has been shown that lesions of the nucleus basalis Meynertiana (the structure which supplies most of the cholinergic input to the cortex) disrupt CTA acquisition (10). Moreover, SN possesses the enzymes required for the synthesis and degradation of ACh, as well as a strictly Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism of ACh release (Lopez-Barcia et al. accompanying paper). Furthermore, injections of cholinergic antagonists within the SN prevent CTA learning (unpublished observations). Thus, it seems reasonable to postulate that SN grafts receive cholinergic input from the host brain which may account for the establishment of the CTA function. This hypothesis is supported by preliminary histochemical observations of acetylcholinesterase-positive fibers in SN grafts (Berasco-Battoni et al., in preparation). We have found that grafted neurons send axons to the thalamus of the host brain in a similar way to that observed in intact animals (8). However, we have not been able to find host fibers within the transplant. Hence, we are not certain whether the AChE-positive fibers actually arise from the host.

The fact that GABA is released by both kinds of grafted tissue independently of their potential to induce behavioral recuperation suggests that neurons within the transplants are viable and that this release is carried out by local circuits within the cortex, as some authors have shown in intact animals. This would explain the lack of correlation between GABA release and learning recovery, observed in the present work, since this connection would not mean communication of the graft with the host.

Regarding glutamic acid release in the grafts, we observed a reduction of the stimulation as compared to control tissue. Preliminary observations from our group suggest that glu levels in the GM are reduced when its afferent fibers from the thalamus are severed. Furthermore, connections between host and GM grafts are not as numerous as those observed in an intact animal (8). Hence, if thalamocortical projections are glutamatergic, as some authors have suggested, this reduction of the stimulated release was not an unexpected finding.

In conclusion, there seems to exist a correlation between ACh released by GM grafts and the induction of CTA learning recovery.

## REFERENCES

- 1.- Fernández-Rettoni, F., Fernández, J., Oluchos, H. A., Aguilar-Roblero, B. and Duchón-Cobin, R. (1987) Cerebral brain transplants induce recuperation of taste aversion learning. *Brain Res.* 416, 147-152.
- 2.- Bjorklund, A., Lindvall, O., Isacson, D., Stenius, P., Wikström, K., Strecher, R. E., Clark, D. J. and Dunnett, S. B. (1987) Mechanisms of action of intracerebral neural transplants: studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum. *Trends Neurosci.* 10, 508-511.
- 3.- Bjorklund, A., Dunnett, S. B. and Stenius, U. (1980) Functional reinnervation of the neostriatum in the rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra. *Cell Tissue Res.* 212, 39-48.
- 4.- Bjorklund, A., Sagal, M. and Stenius, U. (1979) Functional reinnervation of rat hippocampus by locus coeruleus implants. *Brain Res.* 170, 407-424.
- 5.- Bjorklund, A. and Stenius, U. (1981) Intracerebral neural implants: Neuronal replacement and reconnection of damaged circuitries. *Ann. Rev. Neurosci.* 7, 277-306.
- 6.- Braun, J. J., Isquier, F. G. and Nitsch, E. W. (1982) The gustatory neocortex of the rat. *Cerebral. Psychol.* 10, 13-45.
- 7.- Dunnett, S. B. and Bjorklund, A. (1967) Mechanisms of function of neural grafts in the adult mammalian brain. *J. Exp. Biol.* 132, 265-284.
- 8.- Escobar, M., Fernández, J., Saavedra-Aguilar, R. and Fernández-Rettoni, F. (1989) Cerebral Brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gestatory neocortex

lesion. Brain Res. 170, 348-374.

9.- Garcia, I., Laster, P. A., Burch, W. H., Fink, E. and Leach, D. E. (1985) A general theory of aversion learning. Ann. N. Y. Acad. Sci. 443, 8-30.

10.- Jaeger, C. E. and Lund, R. D. (1980) Transplantation of embryonic septal nuclei to the dorsal region of newborn rats: a light microscopic study of organization and connectivity of the transplants. J. Comp. Neurol. 174, 571-577.

11.- Kiefer, S. W. (1985) Neural mediation of conditioned food aversions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 443, 102-107.

12.- Labbe, S., Fink, D., Madison, E. J. and Stern, D. S. (1983) Fetal brain transplants: induction of cognitive deficits in rats with frontal cortex lesions. Science 221, 670-672.

13.- Laster, P. A. and Glazman, D. L. (1985) Cortical substrates of taste aversion learning. Involvement of the dorsolateral amygdala nuclei and temporal neocortex in taste aversion learning. Behav. Neurosci. 77, 257-274.

14.- Low, W. C., Lewis, P. R., Burch, S. T., Dunnett, S. B., Thomas, S. R., Iverson, S. D., Esfahlani, R. and Stanevi, U. (1982) Functional recovery following neural transplantation of embryonic septal nuclei in adult rats with septohippocampal lesions. Nature 300, 253-257.

15.- McLoon, F. C. and Lund, R. D. (1980) Specific projections of retina transplanted to the rat brain. Exp. Brain Res. 40, 273-282.

16.- Morales, E. and Tóspia, R. (1987) Neurotransmitter of the cerebellar glomeruli: uptake and release of labeled t-

aminobutyric acid, glycine, serotonin and choline in a purified glomerulus fraction and in granular layer slices. Brain Res. 420, 11-21.

17.- Stein, D. G., Labbe, K., Firl, A. and Mufson, E. J. (1985) Behavioral recovery following implantation of fetal brain tissue into mature rats with bilateral, cortical lesions. In: Neural Grafting in the Mammalian CNS (eds. Björklund, A. and Stenevi, U.) Elsevier, Amsterdam.

18.- Yardif, K., Kesner, K. P. and Berman, K. F. (1988) Nucleus basalis Magnocellularis is involved in taste aversion learning in rats. Soc. Neurosci. Abstr. 14, 1226.

19.- Yirmiya, R., Zhou, F. C., Holder, M. D., Deems, D. A. and Garcia, J. (1988) Partial recovery of gustatory function after neural tissue transplantation to the lesioned gustatory neocortex. Brain Res. Bull. 20, 619-625.

#### FIGURE LEGENDS

Figure 1.-  $^{14}C$  incorporation by control and experimental animals during pretransplant (white bars) and posttransplant (hatched bars) behavioral tests. Consumption is expressed as the percentage of each group's previous water baseline. \* $p < 0.05$  as compared to control group. \*\* $p < 0.05$  as compared to unoperated animals (Student's t-test).

Figure 2.- Release of labeled GABA from control and grafted GN slices in the presence of  $1.2 \mu M$   $Ca^{2+}$ . After loading the slices with the amino acid, they were superfused as described in Experimental procedures. At 5 min, the superfusion medium was substituted by one containing  $0.7 \mu M$  NEM. Mean values of 8 experiments for control, 7 for homotopic grafts and 5 for heterotopic grafts. The maximum S.E.M. was smaller than 10% of the corresponding mean in all cases.

Fig. 3.- Release of labeled glutamic acid from control and grafted GN slices in the presence of  $1.2 \mu M$   $Ca^{2+}$ . Details as for Fig. 2. Mean values of 8 experiments for each group. The maximum S.E.M. was 21% of the corresponding mean, but for most points it was smaller than 10%.

Fig. 4.- Release of labeled ACh from control and grafted GN slices in the presence of  $Ca^{2+}$ . Details as for Fig. 2. Mean values of 8 experiments for control, 7 experiments for homotopic grafts and 5 experiments for heterotopic grafts. The maximum S.E.M. was 14% of the corresponding mean, but for most points it was smaller than 10%.

Fig. 5.- Release of labeled ACh from GN and occipital cortex slices obtained from 60 days-old animals in the presence of  $1.2$



on CaO. Results for Fig. 2. Mean values of  $\sigma$  are given for each group. The maximum S.E.M. was never greater than 10% of the corresponding mean.

FIGURE 1

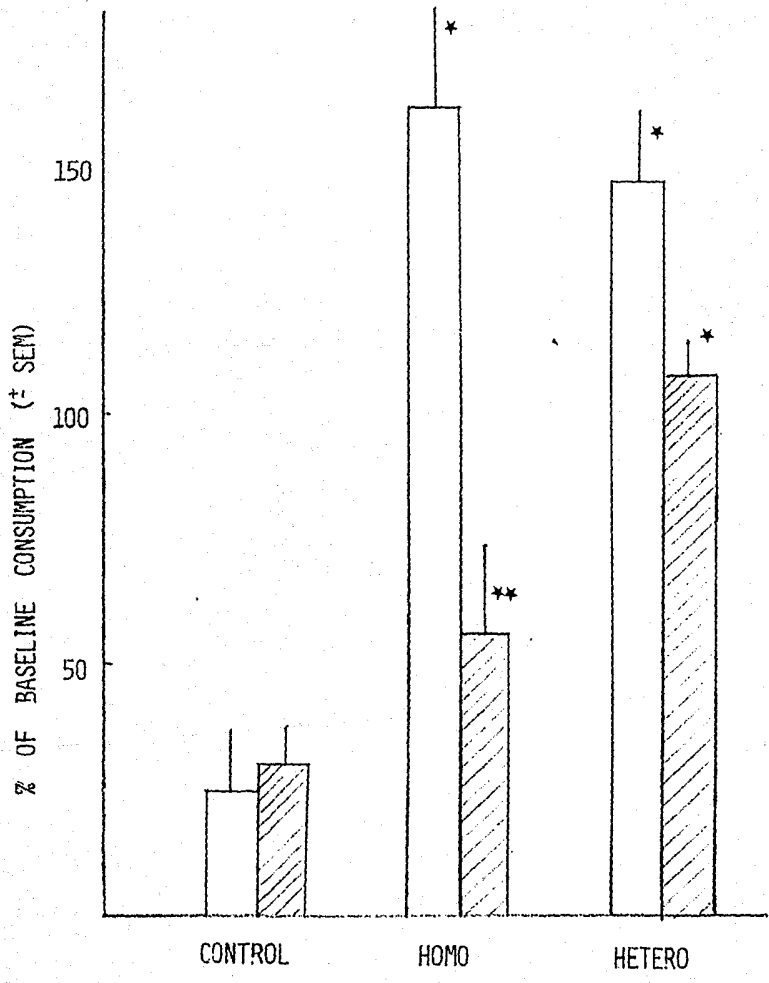


FIGURE 2

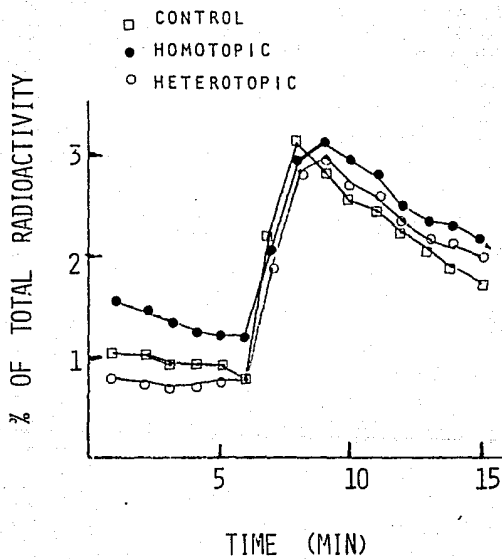


FIGURE 3

● CONTROL  
○ HOMOTOPIC

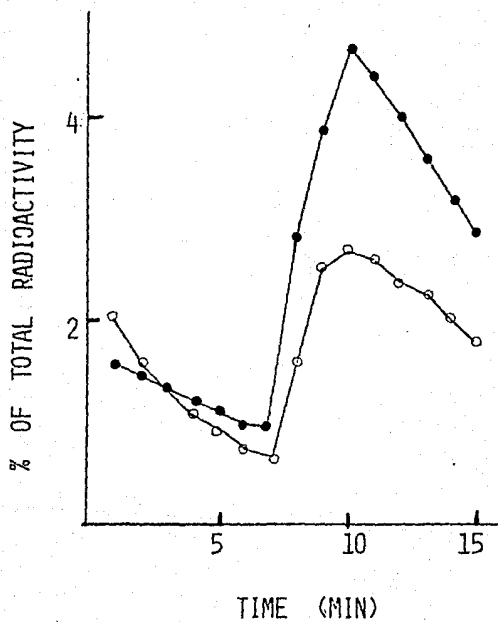


FIGURE 4

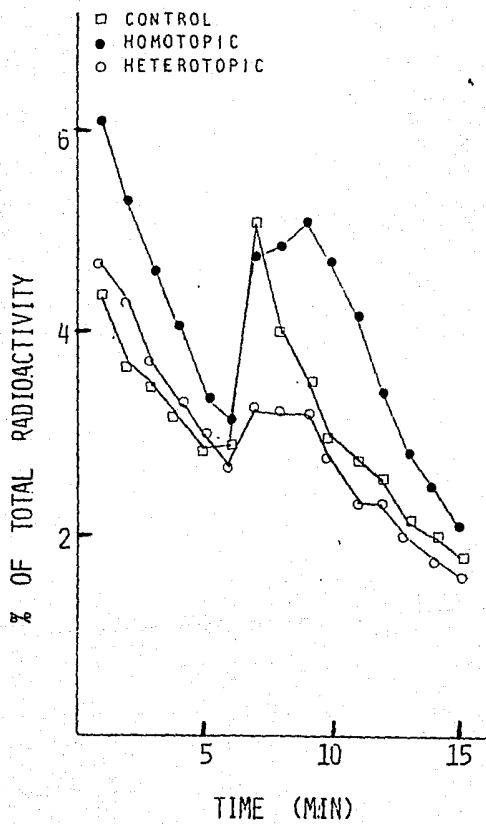


FIGURE 5

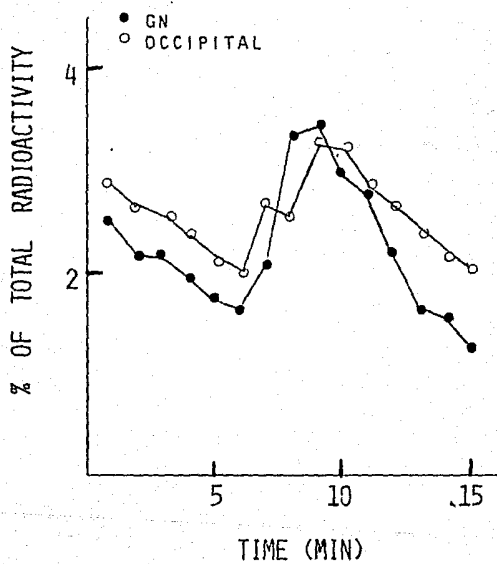


TABLE 1. CORRELATION BETWEEN (<sup>3</sup>H)ACh RELEASE AND BEHAVIORAL RECOVERY

GROUP (N)	CTA RECOVERY	WATER <sup>1</sup> INTAKE	ACh <sup>2</sup> RELEASE	GABA <sup>2</sup> RELEASE
CONTROL (8)	---	26 ± 12	108 ± 32	300 ± 16
HOMOTOPIC (7)	YES	56 ± 17	69 ± 21	252 ± 22
HETEROTOPIC (5)	NO	108 ± 6	20 ± 11	283 ± 38
HOMOTOPIC (5)	NO	96 ± 2,5	21 ± 5	301 ± 39

<sup>1</sup>WATER INTAKE IS EXPRESSED AS PERCENTAGE OF PREVIOUS DAY WATER BASELINE ± SEM

<sup>2</sup>RELEASE OF LABELED COMPOUNDS IS EXPRESSED AS PERCENTAGE OF STIMULATION AT THE PEAK ± SEM

## DISCUSION GENERAL

El principal hallazgo de los presentes trabajos es la aparente correlación entre la recuperación conductual y la liberación de acetilcolina exógena. ¿Puede este fenómeno explicar el proceso de restablecimiento del aprendizaje del CAS? De primera instancia, puede pensarse que existen otros factores involucrados en el proceso. La existencia de factores solubles como el factor de crecimiento nervioso, que favorecen la regeneración de axones dañados tras una lesión ha sido documentada (22,23) y su participación en la recuperación del CAS no puede ser descartada. Más aún, la ligera recuperación que se encuentra en animales con trasplantes heterotópicos puede explicarse invocando este mecanismo (Fig. 1, Trabajo 2).

Sin embargo, una serie de evidencias preliminares indican que la acetilcolina sí juega un papel en el proceso de aprendizaje en animales intactos. En primer lugar, observaciones no publicadas indican que la adquisición del CAS se bloquea con la aplicación local de escopolamina, un antagonista colinérgico muscarínico (60). En estos experimentos, se implantaron cánulas de acero en el cerebro de las ratas, cuyas puntas estaban situadas justamente en la NG. Quince minutos antes de presentar el estímulo condicionado (la solución de LiCl), se inyectó a través de las cánulas una solución de escopolamina 0.5  $\mu\text{M}$ . Se produjo la aversión y, tres días después, los animales fueron probados con una solución de NaCl. El consumo de líquido se abatió en los animales que no recibieron escopolamina, mientras que aquéllos a los que se les administró la droga consumieron cantidades similares a las de un animal lesionado (ver Fig 1.



Trabajo 2).

Por otra parte, se ha demostrado que la acetilcolina participa en la adquisición del CAS mediada por otra estructura, la amígdala (Fig. 6). Inyecciones del mismo antagonista colinérgico en la amígdala de animales canulados interfiere con la adquisición del CAS (61).

Ya han sido mencionadas otras evidencias de que la acetilcolina participa en la adquisición del CAS. Por ejemplo, lesiones del núcleo basalis Magnocellularis impiden la adquisición del CAS en ratas (62). Dicho núcleo es altamente colinérgico y proyecta hacia un gran número de estructuras del SNC incluyendo a la corteza y a la amígdala. Sin embargo, parece ser que su proyección amígdalina no está implicada en el proceso (62). De este modo, los datos sugieren que las fibras que envía a la corteza pueden estar involucradas en la adquisición del CAS.

Con respecto a los trasplantes, observaciones preliminares sugieren la presencia de fibras positivas para la detección histoquímica de acetilcolinesterasa en trasplantes homotópicos (Bermúdez-Rattoni y cols., en preparación).

Todos estos resultados indican que la acetilcolina puede estar implicada en la recuperación del aprendizaje. Como el papel de este neurotransmisor en procesos de aprendizaje y memoria está bien documentado (57), resultaría interesante investigar más profundamente su papel en la recuperación conductual observada en nuestro modelo de CAS.

Para lograr tal objetivo, podría determinarse la actividad de las enzimas de síntesis y de degradación de la acetilcolina en

los trasplantes. Si el transmisor está implicado en la integración de los hábitos alimenticios y en la recuperación conductual, debe ser posible determinar la actividad de dichas enzimas en homogenizados de trasplantes homotópicos y no así en heterotópicos o, al menos, encontrar una disminución en estos últimos.

De igual forma, se podría determinar el curso temporal de la recuperación conductual relacionada a la liberación de acetilcolina. Bermúdez-Kattoni y cols. (en preparación) han determinado el curso temporal de la recuperación conductual estudiando la aversión adquirida quince, treinta y sesenta días después de recibir el trasplante. Sus datos indican que, mientras que a los sesenta días postransplante la recuperación es máxima, a los quince días los animales no son capaces de asociar la irritación gástrica con el estímulo gustativo. Por lo tanto, si la recuperación conductual está asociada a la liberación de acetilcolina, los trasplantes de quince días no deben presentar dicha capacidad, mientras que los de sesenta sí. Además, podría medirse la liberación endógena de acetilcolina; es decir, establecer si la liberación puede ocurrir a un nivel más fisiológico midiendo las pozas liberables de acetilcolina en la NG intacta y en la transplantada.

En resumen, el proceso de recuperación conductual inducido por trasplantes de tejido cerebral fetal es multifactorial. No es posible explicar el fenómeno invocando sólo un mecanismo. Sin embargo, las evidencias de la participación de la acetilcolina en el proceso son sólidas y puede concluirse que, muy probablemente, juega un papel importante en la adquisición del CAS en la NG.

## REFERENCIAS

- 1.- Bjerkedal, A. y Steward, M. Growth of central catecholaminergic neurons into sensory axolemma grafts in the rat mesencephalon. *Brain Res.* 11: 1-20, 1971.
- 2.- Bar, G. D. y Altman, J. Transplanted precursors of nerve cells: their fate in the neocortex of young rats. *Science* 173: 437-439, 1971.
- 3.- Madhoun, L., Drouot-Giffin, E., Drouot, M., Hertzog-Bista, G., Tesson, G. y Barrois, J. B. Spino-tectal and tectal grafts: an original addition to the nigro-striatal pathway in two patients with idiopathic Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 291: 331-333, 1974.
- 4.- Thompson, M. C. Successful brain grafting. *U. S. J.* 6: 267-269, 1959.
- 5.- Bergman, J. Motor-til. Dræmning, vidhållning och återbildning av periphera nervans axoner hos en Regenerations försökman. *Acta. Orth. Scand. Fysiol. Med.* 1: 13, 1978.
- 6.- Del Duca, G. Rappresentazione delle sudorazioni cutanee nei Gabbiani. *Atti. Soc. Ital. Sci. Nat.* 42: 113-120, 1977.
- 7.- Barson, S. M. Transplantation of the spinal ganglion into the brain. *Quart. J. Med.* 11: 173-178, 1949.
- 8.- Tello, F. La influencia del nervio espinal en la regeneración de los centros nerviosos. *Trab. Inst. Nac. Sci. Univ. Neur.* 9: 123-159, 1911.
- 9.- Dunn, F. H., Eichen, and Schindler, findings in a series of attempts to transplant cerebral cortex in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 27: 545-582, 1917.
- 10.- Le Gros Clark, W. C. Neuronal differentiation in implanted fetal cerebral tissue. *J. Neurol. Psychol.* 31: 263-269, 1910.
- 11.- Malpas, R., Papp, L. y Ulfarvik, E. Hypophysial spine area in the hypothalamus. *J. Endocr.* 25: 167-177, 1962.
- 12.- Gatzert, G. Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res.* 11: 25-33, 1969.
- 13.- Steward, M., Bjerkedal, A. y Svendsgaard, H. Transplantation of central and peripheral dopamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival. *Brain Res.* 114: 1-20, 1976.
- 14.- Bar, G. D., Malpas, R. M. y Bell, E. G. Transplantation of brain tissue in the brain of the rat. V. Growth characteristics

of neocortical transplants from young and old donor ages. *Exp. J. Anat.* 150: 173-187, 1971.

15 - Miller, B. H., Dow, S. D., y Goo, H. G. Transplantation of brain tissue in the brain of the rat. II. Growth and characteristics of neocortical transplants in hosts of different ages. *Exp. J. Anat.* 150: 147-175, 1970.

16 - Bjorklund, A., Schmidt, R. H., y Stenavi, U. Functional reorganization of the neocortex in the rat by use of intracerebral grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra. *Cell Tissue Res.* 110: 39-48, 1974.

17 - Ghilfi, V. Transplantation of rat dopamine in adult heterologous animals. *Exp. Med. World* 1: 94-10, 1971.

18 - Erundin, P., Nilsson, G. G., Ruge, P. H., y Bjorklund, A. Cyclosporin A increases survival of cross-species intracerebral grafts of dopamine neurons containing neurons. *Expt. Brain Res.* 30: 201-208, 1978.

19 - Berger, C. E., y Lund, R. E. Transplantation of embryonic occipital cortex to the focal region of newborn rats: a light microscopic study of organization and connectivity of the transplants. *J. Comp. Neurol.* 184: 311-377, 1976.

20 - Moore, L. E., Bjorklund, A., y Stenavi, U. Intracerebral neural implants in the adult rat brain. I. Growth and mature organization of brain stem, cerebellar and hippocampal implants. *J. Comp. Neurol.* 210: 437-469, 1983.

21 - Dunnett, S. B., y Bjorklund, A. Mechanisms of function of neural grafts in the adult mammalian brain. *J. Exp. Biol.* 198: 245-269, 1987.

22 - Nishi-Saegusa, M., Watanabe, S., K., Nishida, D., y Larson, J., y Cotman, C. W. The survival of brain transplants is enhanced by estrone from injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 4222-4224, 1984.

23 - Moore, L., Bjorklund, A., y Stenavi, U. Stimulation of growth of new neural sprouts from lesioned mammalian neurons in adult rat brain by nerve growth factor. *Brain Res.* 90: 161-176, 1977.

24 - Leibe, S., Fink, G., Mufson, E. J., y Stein, D. G. Fetal brain transplants: reduction of cognitive deficits in rats with frontal cortex lesions. *Science* 221: 470-472, 1982.

25 - Olivero-Malart, R. M., y Cotman, C. W. Differentiation of cerebellar cells heterotopically transplanted to adult rat brain: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 210: 247-267, 1982.

26 - Dunnett, S. B., Tomblin, G., Fink, G., Ryan, L. M.,

Ricklund, O. & Larsson, S. D. Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of rats with lesions of nucleus basalis neostriatalis. II. Sensorimotor and learning impairment. *Neuroscience* 10: 727-737, 1983.

27. - Lark, M. G., Levin, D. R., Bunch, D. T., Dunnett, S. B., Thomas, S. R., Larsson, S. D., Ricklund, O., & Slomov, U. Functional recovery following neural transplantation of embryonic septal nuclei in adult rats with septohippocampal lesions. *Nature* 299: 269-272, 1982.

28. - Ricklund, O., DiGrego, M. y Swadlow, H. Growth of transplanted hippocampal neurons into the adult hippocampus along the pyramidal path. *Nature* 282: 737-739, 1979.

29. - Ricklund, O., Segal, M., & Eric, J. W. Functional reinnervation of hippocampus by lesion susceptible septa. *Brain Res.* 170: 409-426, 1979.

30. - Ricklund, O., Lindvall, O., Larsson, S., Brundin, P., Niclérin, M., Clarke, R. E., Clark, D. J., Dunnett, S. B. Mechanisms of action of intracerebral neural implants: studies on signal and striatal grafts to the lesioned striatum. *Trans Neurosci* 10: 509-514, 1987.

31. - Mallory, R. D. y Bee, C. D. *Neural Grafts Transplantation research*. Springer Verlag, 1983.

32. - Dunnett, S. B., Syce, D. H., Levin, F. D., Reynolds, H. y Bunch, T. Functional consequences of embryonic neocortex transplants in rats with prefrontal cortex lesions. *Behav. Neurosci.* 101: 499-502, 1981.

33. - Kravitz, E. R., Khat-Sampedro, H., Gibbs, S. y Cotman, C. W. Transplants of purified embryonic primate thalamic sensory afferents after frontal cortex ablation. *Exp. Neurol.* 52: 377-390, 1980.

34. - Agnaya, A. J., Ricklund, O., Slomov, U. y Carlstedt, T. Total septohippocampal neurotomy and entorhinal long axons across CNS grafts labeled into the adult striatum. *Neurosci. Lett.* 43: 57-60, 1984.

35. - Gibson, M. J., Kricher, D. T., Charlton, H. H., Zimmerman, E. A., Silverstein, S. J. y Perlow, H. G. Mating and pregnancy can occur in postnatally hypogonadal mice with preoptic area brain grafts. *Science* 223: 947-951, 1984.

36. - Nelson, S. C. y Lind, R. S. Specific projections of retina transplanted to the rat brain. *Exp. Brain Res.* 101: 213-222, 1980.

37. - Ricklund, O. y DiGrego, U. Intracerebral neural implants: Neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries. *Ann. Rev. Neurosci.* 7: 379-408, 1984.

38. - Garcia, J. The evolution of acting safely. *Brain Res. Anat.*

Bull. Univ. Calif., Los Angeles 41: 245, 1962.

39.- Elliot, S. C., Galambos, N. H., Schneberger, S. H. Conditioned taste aversion: A field application to coyote predators on sheep. Behav. Mon. 29: 91-92, 1977.

40.- Fernández-Rodríguez, F. L. Integración neural de los hábitos alimenticios. Bol. Estud. Med. Biol. 34: 43-55, 1968.

41.- Garcia, J. y Mowler, R. A. Relation of the cue to consequences in vicarious learning. Psychon. Sci. 3: 123-124, 1964.

42.- Denjan, M. Saline-induced anorexia in rats: Role of stimulus generalization of CIA. Animal Learning and Behav. 3: 205-210, 1975.

43.- Kandel, E. R. y Schwartz, J. H. Principles of Neural Science. Elsevier, 1981.

44.- Castro, M. E. De the central course of afferent fibres in the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagal nerves and their nuclei in the mouse. Acta Physiol. Scand. (Suppl. 106): 27: 307-320, 1955.

45.- Robinson, D. L. y Kava, S. D. Physiology and pharmacology of vomiting. Pharmacol. Rev. 31: 193-230, 1983.

46.- Grill, H. J. y Norgren, R. The taste reactivity test. II. Mictic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic deafferented rats. Brain Res. 143: 281-297, 1978.

47.- Schwartzbar, J. S. Microphysiology of taste-mediated functions in parabrachial nuclei of behaving rabbit. Brain Res. Bull. 11: 42-49, 1983.

48.- Nantyh, P. W. y Hunt, S. P. Neuropeptides are present in projection neurons at all levels in visceral and taste pathways from periphery to sensory cortex. Brain Res. 279: 297-311, 1984.

49.- Fukushima, T. y Ferris, M. L. Organization of trigeminothalamic tracts and other thalamic afferent systems of the brainstem in the rat: Presence of gelatinosa neurons with thalamic connections. J. Comp. Neurol. 183: 159-184, 1977.

50.- Braun, J. J., Lasiter, P. S. y Kiefer, S. W. The gustatory neocortex of the rat. Physiol. Psychol. 10: 13-48, 1982.

51.- Kiefer, S. W., Rusiniak, K. W., Garcia, J. Flavor-illness aversion: Potentiation of odor by taste in rats with gustatory neocortex ablation. J. Comp. Physiol. Psychol. 70: 540-548, 1982.

52.- Fernández-Rodríguez, F., Fernández, A., Sánchez, H. G., Aguilar-Rodríguez, R. y Bracher-Godin, R. Retal brain transplants

inhibitory effects of taste aversion learning. *Behav. Mon.* 41b: 147-150, 1967.

53 - Bercher, M., Fernández, J., Suarez-Villa, R. y Bercher-Rafael, F. Fetal Brain grafts: Induce recovery of learning deficits and sensitivity in rats with gustatory neocortical lesion. *Brain Res.* 472: 364-374, 1979.

54 - Bode, F. H. y Czehlinski, A. Enhanced graft survival in the hippocampus following selective denervation. *Neuroscience* 17, 29-32, 1984.

55 - DeGroot, J. Neurotransmitters in cerebral cortex: a general account. En: E. G. Jones y A. Peters (Eds.), *Cerebral cortex Volume 2. Functional properties of cortical cells*. Plenum Press, New York, 1994. pp. 27-41.

56 - Houser, C. R., Vaughn, J. E., Myers, E. M. G., James, G. J. y Peters, A. GABA neurons in the cerebral cortex. En: E. G. Jones y A. Peters (Eds.), *Cerebral cortex Volume 2. Functional properties of cortical cells*. Plenum Press, New York, 1984. pp. 43-82.

57 - Moss, D. E. y Denton, J. A. Review of cholinergic mechanisms and memory. En: F. G. Nassar (Ed.), *Cholinergic mechanisms*. Raven Press, New York, 1979. pp. 403-472.

58 - Marsley, J. K. Autoradiographic localization of receptor sites in the cerebral cortex. En: E. G. Jones y A. Peters (Eds.), *Cerebral cortex Volume 2. Functional properties of cortical cells*. Plenum Press, New York, 1984. pp. 175-202.

59 - Street, P. Glutamatergic and dopaminergic transmitter candidates for systems of the cerebral cortex. En: E. G. Jones y A. Peters (Eds.), *Cerebral cortex Volume 2. Functional properties of cortical cells*. Plenum Press, New York, 1984. pp. 119-143.

60 - López-Cerdá, J. G., Fernández, J., Bermejo-Rico, F. y Tapia, R. La utilización de la neurocirugía quirúrgica participada en la adquisición de un condicionamiento aversivo a los sabores. XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Querétaro, México, 1988.

61 - Bermejo-Rico, F., Salas, C. V., Niefel, S. W. y García, J. Flavor-illness aversion: The role of the amygdala in the acquisition of taste potentiation and aversions. *Physiol. Behav.* 33, 507-508, 1984.

62 - Tardif, R., Marcer, R. P. y Berman, K. F. Nucleus basalis Magnocellularis is involved in taste aversion learning in rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14: 1226, 1988.