

03062
rej. 12

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

**PAPEL DE LOS TRANSPLANTES CEREBRALES EN LA RECUPERACION DEL
APRENDIZAJE Y LA ACTIVIDAD MOTORA EN RATAS CON LESIONES
ESTRIATALES**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
PRESENTA**

ANA LUISA PIRA HERNANDEZ

MEXICO, 1989

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó con la asesoría académica del Dr. Federico Bermúdez Rattoni, en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

INDICE

PROLOGO

INTRODUCCION

El Neeestriado	1
El estriado en la integración motora	9
El estriado en procesos de aprendizaje y memoria	18
Transplantes de tejido cerebral	22
Transplantes al estriado	32

SECCION EXPERIMENTAL

TRABAJO I Differential recovery of passive avoidance and motor activity by striatal and sustantia nigra grafts	39
TRABAJO II Transplantes de corteza frontal	58
TRABAJO III Marcaje de tejido neural: virus sendai	69

DISCUSION GENERAL	80
-------------------	----

REFERENCIAS	88
-------------	----

PROLOGO

En el presente trabajo hemos tenido la oportunidad de conjuntar dos modelos experimentales, los cuales, por si mismos, han dado lugar a una gran cantidad de conocimientos y conceptos muy importantes en Neurociencias: por un lado, el sistema nigro-estriatal, que esta involucrado en el control de la integración motora, así como en procesos de aprendizaje y memoria; y por otro lado, los transplantes de tejido neural, que hoy en día han resultado ser herramientas útiles en el estudio de la diferenciación, funcionamiento y plasticidad del sistema nervioso central.

Es así, que el objetivo central de este trabajo radica en el estudio de los efectos de los transplantes de tejido cerebral fetal en la recuperación de las conductas motora y de aprendizaje de ratas con lesiones bilaterales electrolíticas del estriado.

Para abordar el trabajo experimental, hemos dividido la presente tesis de manera que se cuenta con una sección introductoria en donde se plantean brevemente los aspectos más relevantes con respecto a la anatomía y función del neocestriado, y a su participación en el control motor y de otras funciones de gran complejidad, como lo son el aprendizaje y la memoria. Enseguida, se ha intentado elaborar una descripción escueta sobre la técnica de los tranplantes cerebrales y su participación en el

estudio del funcionamiento del sistema nervioso central. Asimismo, se incluye una sección del estudio de los tranplantes al estriado.

La sección experimental da inicio con un artículo que incluye la mayor parte del trabajo elaborado durante la maestría, que comprende los estudios sobre el papel de los transplantes de sustancia nigra y del estriado fetales, en la recuperación de la actividad motora y el aprendizaje, respectivamente. En segundo término se encuentran los experimentos sobre transplantes heterotópicos de corteza frontal fetal. Esta sección termina con el estudio del marcaje de células de tejido neural por medio de virus sendai.

Finalmente se encuentra la sección de discusión general, en donde se intenta englobar los aspectos relevantes de los trabajos desarrollados, con especial énfasis en los resultados obtenidos de las observaciones con los transplantes.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

EL NEOESTRIADO

El término Ganglios Basales se refiere a grandes núcleos subcorticales, derivados del cerebro anterior. Anatómicamente están constituidos por dos componentes principales: 1) El cuerpo estriado, cuya función ha sido asociada a la regulación de la actividad y comportamiento motor, y 2) el complejo amigdalino, asociado al sistema límbico (Herrera-Marschitz, 1980). Asimismo algunos autores incluyen al núcleo subtalámico y a la sustancia nigra como componentes de los ganglios basales (Nauta y Domesick, 1984).

El cuerpo estriado comprende tres núcleos denominados caudado, putamen y globus pallidus (o núcleo lentiforme, que a su vez incluye el fundus striati, el septo del núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio y la sustancia innominada o núcleo basalis de Meynert). En los mamíferos, el núcleo caudado y el putamen conforman una porción telencefálica denominada neostriado, el cual constituye la mayor entrada de fibras aferentes al cuerpo estriado, mientras que el globus pallidus, también llamado paleostriado, contribuye con la mayor parte de las fibras eferentes. En los carnívoros y en los primates la cápsula interna forma un conjunto de fibras que separa al caudado del putamen. En los mamíferos más pequeños, tales como los roedores, el caudado y el putamen forman una sola entidad, la cual es atravesada por

fibras dispersas de la cápsula interna. Así pues, el término estriado, engloba, en estas especies a ambos núcleos (Herrera-Marschitz, 1986), siendo este el contexto en el que, el término estriado, será empleado en el presente trabajo y como sinónimo de neostriado.

El cuerpo estriado ha sido considerado como el componente principal del Sistema Extrapiramidal, concepto, que agrupa aquellas estructuras relacionadas con la integración motora, y que incluyen al estriado, al núcleo subtalámico, al núcleo interstitialis, al núcleo rojo, la sustancia nigra, parte del tálamo y de la formación reticular del tallo cerebral. (ver fig. 1) (Graybiel y Ragsdale, 1983). Las funciones de estas estructuras han sido inferidas con base en estudios de una gran variedad de síndromes clínicos (Wilson, 1914). De hecho, las anomalías de los ganglios basales han sido asociadas por lo menos con 4 síndromes clínicos mayores: la Enfermedad de Parkinson, la Corea de Huntington, la Esquizofrenia y la Enfermedad de Alzheimer (Marsden, 1982; Coyle et al., 1983; Coyle y Schwarcz, 1978).

El progreso significativo en el conocimiento de la organización morfológica y funcional de los ganglios basales fue iniciado por la demostración y mapeo de las vías monoaminérgicas (Anden et al., 1964; Fuxe, 1965, 1977; Ungerstedt, 1971a). así como por el descubrimiento y la descripción de neurotoxinas específicas como la 6-hidroxi dopamina (6OHDA) (Malmfors y Sachs, 1968; Ungerstedt, 1968, 1971b), del ácido kainico (AK) (Coyle y

Shwarcz,1976; McGeer y McGeer, 1976) y del ácido iboténico (AIB) (Wieland, 1968; Johnston et al., Shwarcz,1979). Así la clasificación estricta de las células nerviosas dentro de estos núcleos, con base en criterios anatómicos, se pueden complementar con una clasificación basada en criterios neuroquímicos, los cuales definen con mayor exactitud las características de los elementos histológicos, que conforman dichas vías. De igual forma, el descubrimiento de las neurotoxinas específicas, ha hecho posible el desarrollo de modelos experimentales que han puesto de manifiesto las relaciones funcionales existentes entre vías neuronales y sus neurotransmisores, con síndromes específicos del comportamiento.(Herrera-Marschitz, 1980).

En la figura 2, se muestra el diagrama que resume tanto las vías aferentes como eferentes del estriado. Como mencionamos, el estriado constituye la principal puerta de entrada de vías a los ganglios basales; recibe conexiones aferentes de la pars compacta de la sustancia nigra, del área ventral tegmental, de la corteza sensoriomotora y del núcleo intralaminar del tálamo. Asimismo algunas aferentes parecen provenir de la amígdala, del núcleo del rafe dorsal, del cerebro medio y del locus coeruleus. En contraste, las conexiones eferentes del estriado se establecen exclusivamente por axones mielinizados delgados que pasan en forma medial desde su origen (Haces en Lápiz)(Wilson,1914), y que convergen en el globus pallidus. Según los estudios de Nauta y Domesick (1964), estos haces pasan a través de las áreas lateral y medial

del globus pallidus y continúan extendiéndose a través del pálido hasta la sustancia nigra, pars reticulata y el núcleo entopeduncular.

Finalmente, el estriado de la rata puede dividirse en a) la región ventromedial que recibe la aferentes del sistema límbico, que incluye al núcleo accumbens y b) la región dorsolateral "no límbica" que recibe las principales aferentes de la corteza motora. (Nauta y Domesick, 1964).

FIGURA 1

Diagrama que representa varios de los componentes del sistema Extrapiramidal de los mamíferos. núcleo caudado (Cd); putamen (Put); globus pallidus (GP); sustancia nigra pars compacta (SNc); sustancia nigra pars reticulata (SNr); Área ventral tegmental (VTA); núcleo parafascicular del tálamo (PF); subtálamo (ST); núcleo acumbens (Ac); núcleo basal de la estria terminalis (Bst); sustancia innominada (SI); núcleo intersticial de Cajal (InC); núcleo magnocelular del núcleo rojo (RM); rafe (R); núcleo ventral anterior (VA); núcleo ventral lateral (VL); núcleo centromedial del tálamo (CM); núcleo ventromedial del hipotálamo (vmh); núcleo linearis del rafe (LC); médula espinal (SE); oliva inferior (IO); zona incerta (ZI). Modificado de Herrera-Marschitz, 1986.

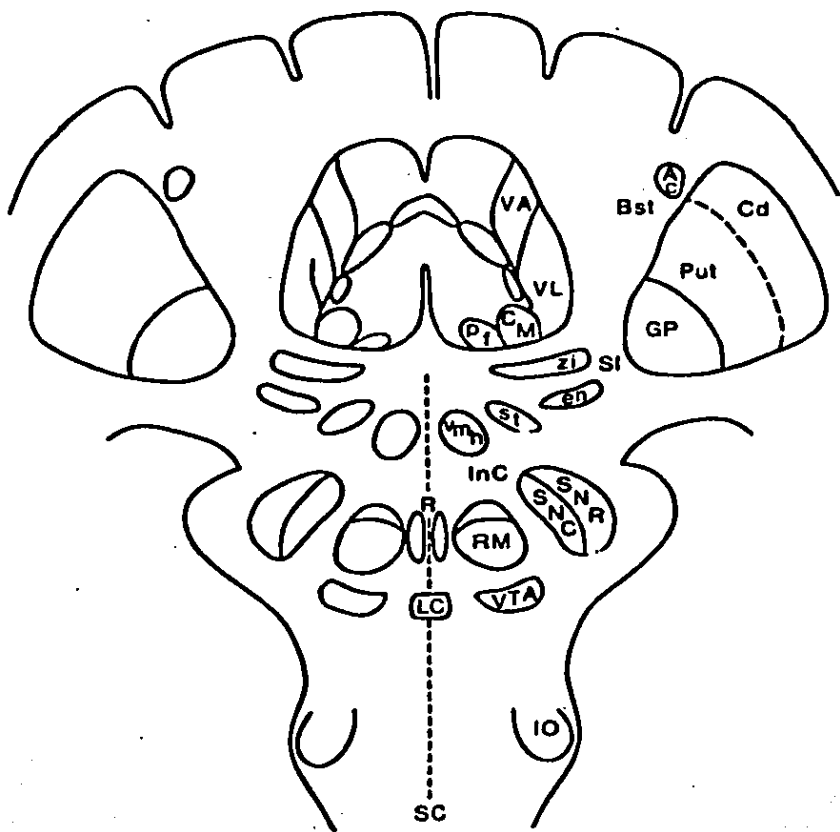


FIG. 1

FIGURA 2

Esquema que representa las vías aferentes y eferentes de los Ganglios basales. (Modificado de Coté y Crutcher, 1980).

EL ESTRIADO EN LA INTEGRACION MOTORA

La inyección de 5-OHDA en áreas que contienen terminales o cuerpos celulares monoaminérgicos, produce una degeneración selectiva y localizada de las neuronas noradrenérgicas y dopaminérgicas, (Ungerstedt, 1968, 1971a). El sistema dopaminérgico nigroestriatal es particularmente sensible a la 5-OHDA (Ungerstedt, 1971a). Las inyecciones bilaterales de 5-OHDA en la sustancia nigra o en los axones ascendentes del sistema dopaminérgico nigro-estriatal, producen una disminución de la fluorescencia para DA en las terminales nerviosas del cuerpo estriado; este fenómeno se ve acompañado por un síndrome conductual, caracterizado por acinesia, pérdida del comportamiento de exploración, dificultad para iniciar actividad, adipsia y afagia (Ungerstedt, 1971b). El desarrollo de estos síntomas se correlaciona, en gran medida, con la extensión de la degeneración del sistema dopaminérgico nigro-estriatal, y pueden ser revertidos mediante la aplicación de agonistas de la DA (Ljungberg y Ungerstedt, 1976). Estos experimentos apoyan la idea de que el sistema dopaminérgico del estriado está involucrado en el control del comportamiento motor e inclusive en la integración sensoriomotora o en la generación de estímulos necesarios para el desempeño de un determinado número de actividades. (Herrera-Marschitz, 1976).

Dadas las características de la vía dopaminérgica nigroestriatal (monosináptica e ipsilateral) (Anden et al., 1984;

Ungerstedt, 1971a), este sistema constituye un excelente modelo para el estudio de las alteraciones funcionales causadas por la disminución o aumento de la neurotransmisión de la DA. De esta manera, la dominancia unilateral de la transmisión de DA da por resultado una asimetría en postura y movimiento de los sujetos lesionados (Anden *et al.*, 1967). Esta asimetría también es producida por la disminución o el aumento de la actividad unilateral de una de las vías dopaminérgicas nigro-estriatales (Anden, 1967; Ungerstedt y Arbuthnott, 1970). Así, la dirección de la asimetría refleja cual es la vía dominante.

La predictibilidad de este modelo se complica por el hecho de que las lesiones que impiden de manera selectiva el buen funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas, producen un aumento de la sensibilidad a la DA por parte de los receptores localizados en el área afectada (Anden *et al.*, 1967; Ungerstedt, 1971b). Ungerstedt *et al.*, (1970; 1971a,b y 1981), demostraron que después de la denervación unilateral dopaminérgica con 6OHDA, las ratas desarrollan una desviación de postura ipsilateral a la denervación, acompañada de falta de atención a la estimulación que proviene del campo sensorial contralateral. Esta alteración postural puede transformarse en un fuerte comportamiento de giro ipsilateral por administración de amfetamina. El efecto de este fármaco ha sido asociado a la estimulación de la liberación de DA en las terminales nerviosas del lado intacto (Fuxe y Ungerstedt, 1970; Ungerstedt y Arbuthnott, 1970). Sin embargo las mismas ratas

rotan en dirección opuesta, giro contralateral, cuando se les administra algún agonista dopaminérgico, como la apomorfina (Ernst, 1967; Anden et al., 1967). El efecto de la apomorfina es interpretado como una acción preferente sobre los receptores postsinápticos de la DA, localizados en el lado denervado, el cual está hipersensibilizado por la acción de la 5-OHDA (Ungerstedt, 1971b). Estos hallazgos han dado lugar al desarrollo de un modelo experimental en el cual el comportamiento de las ratas puede relacionarse directamente con eventos pre o postsinápticos, que involucran un neurotransmisor particular. Así, la dirección del giro producido por la administración de fármacos en ratas denervadas por 5-OHDA, corresponde a un mecanismo de acción en la sinápsis dopaminérgica (fig. 3D). El giro ipsilateral es producido por un incremento en la concentración de DA en la hendidura sináptica del lado intacto, como consecuencia, probablemente, de la estimulación de la liberación de DA, por inhibición de la actividad de las enzimas de degradación o del bloqueo del mecanismo de recaptura de DA. En contraparte, la rotación contralateral es debida a fármacos que estimulan directamente los receptores dopaminérgicos del lado denervado.

Por otro lado, este modelo ha sido empleado para el estudio experimental de la enfermedad de Parkinson, la cual se caracteriza por temblor en reposo, rigidez, bradicinesia e impedimento de algunos reflejos de la postura; aunque la pérdida de células puede observarse en varios núcleos cerebrales (núcleos del rafe, locus

ceruleus y núcleo motor del vago) (Scatton, et al., 1983), la degeneración neuronal de esta enfermedad, se ubica principalmente en la pars compacta de la sustancia nigra (Bernheimer et al., 1973), inclusive hay evidencia de que la mayor parte de la sintomatología de esta enfermedad, se relaciona de manera específica con la pérdida de estas neuronas y a consecuencia de la degeneración de la inervación dopaminérgica del estriado (Bernheimer et al., 1975). De hecho la administración sistémica de fármacos agonistas de la DA y precursores de la misma como la L-DOPA, tienen efectos terapéuticos benéficos, lo que sugiere que la inervación dopaminérgica del estriado pudiera estar funcionalmente íntegra (Freed, 1986a).

Otro síndrome que frecuentemente se asocia al mal funcionamiento de la vía dopaminérgica nigro-estriatal es la enfermedad de Huntington. Esta enfermedad hereditaria (autosómica dominante), se caracteriza por movimientos coreiformes involuntarios y demencia progresiva. Las anomalías morfológicas mayores se encuentran en el neostriado y consisten básicamente en la pérdida de neuronas y astrogliosis (Bruyn, 1970). El defecto bioquímico que resulta de la destrucción selectiva de neuronas, aún no ha sido bien determinado, aunque se le asocia con la reducción de colina-acetil-transferasa y de la descarboxilasa glutámica (Heindel et al., 1988), además de la alteración de las vías dopaminérgicas. Se conoce la existencia de un circuito que se establece entre la sustancia nigra y el

estriado (Fig. 4); la deficiencia de alguno de sus componentes ya sea la vía dopaminérgica nigro-estriatal, las interneuronas colinérgicas o las vías gabaérgicas estriato-nigral y estriato-palidial, crea un desajuste en su integración funcional. Se propone entonces que las células dopaminérgicas de la sustancia nigra se desinhiben debido a que existen deficiencias en la acción de las neuronas gabaérgicas inhibitorias; si la dopamina actúa en forma excitatoria sobre las neuronas estriatales (lo cual, aún esta en discusión), entonces la desinhibición puede producir excitación excesiva de las neuronas estriatales que aún subsistan, dando por resultado una entrada excesiva de señales desde el globus pallidus hacia el tálamo, lo que podría producir los movimientos coreicos característicos de la enfermedad de Huntington; incluso, la administración de L-DOPA a estos pacientes acentúa la sintomatología motora. Asimismo, la administración excesiva de L-DOPA en pacientes con enfermedad de Parkinson, producen movimientos involuntarios coreiformes, atetósicos y distónicos. Así pues, la disfunción del circuito descrito puede causar movimientos involuntarios, que en la mayor parte de los casos, se atribuyen a la acción de la dopamina (excitatoria o inhibitoria) (Côté y Crutcher, 1985).

FIGURA 3

Diagrama que representa una sinapsis dopaminérgica (Según Ungerstedt et al., 1981).

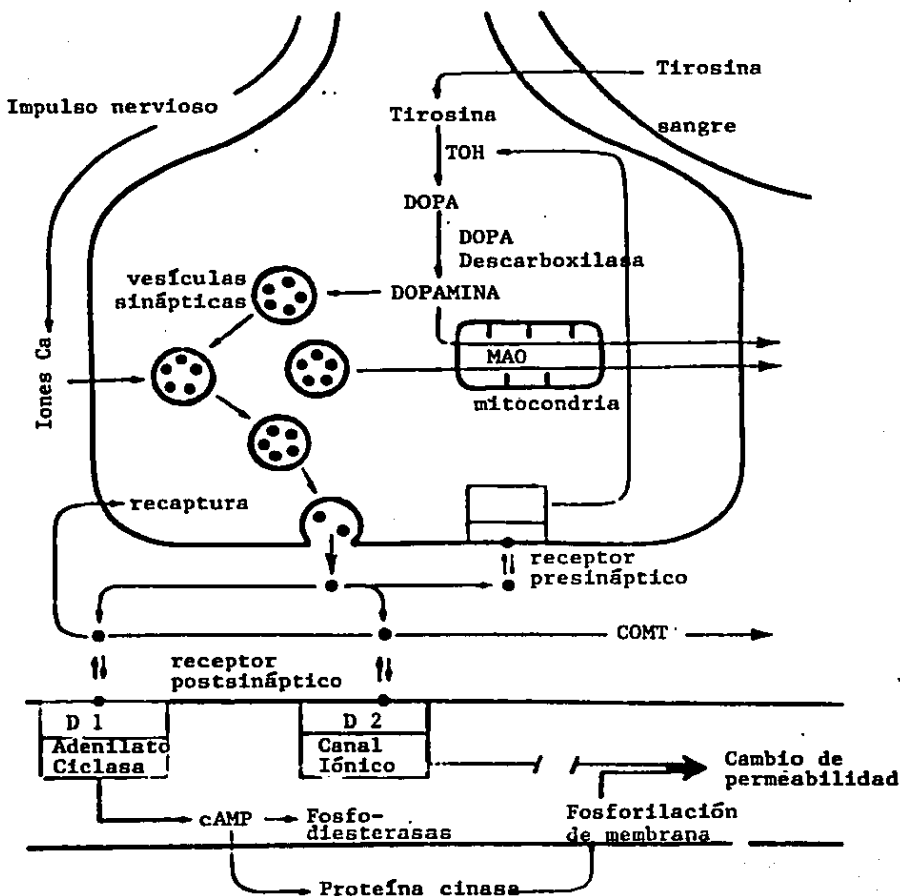


FIG. 3

FIGURA 4

Esquema representativo de la relación entre las vías estriatales aferentes y eferentes, con los neurotransmisores involucrados. (Tomado de Côté y Crutcher, 1985).

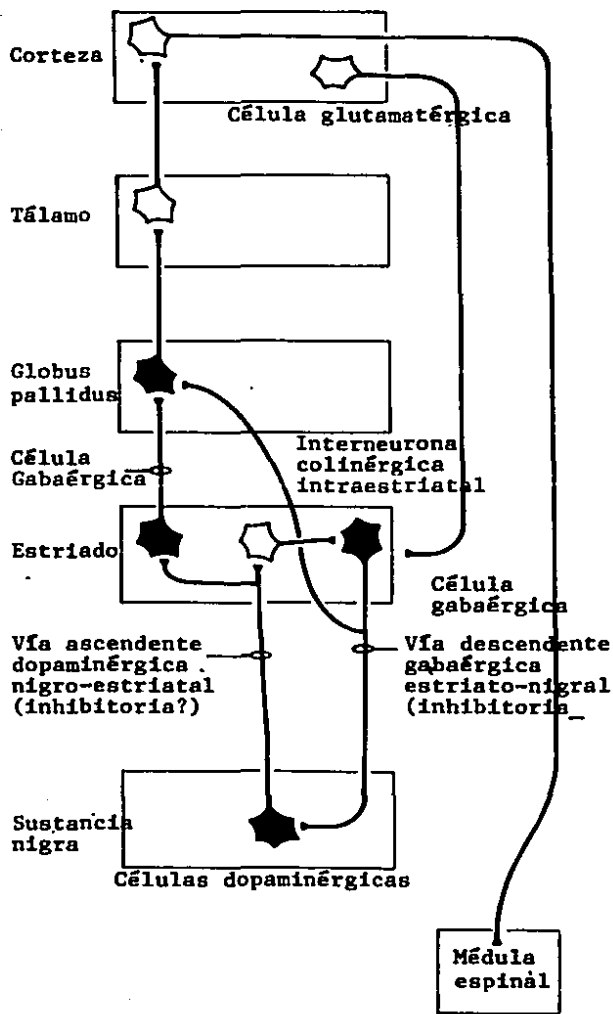


FIG. 4

EL ESTRIADO EN PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

El estriado interviene en diversos procesos de integración neural; en un principio, se consideró que intervenía exclusivamente en funciones de regulación del movimiento, sin embargo, diversos autores han reportado que además está involucrado en procesos de aprendizaje y memoria, inclusive se ha postulado que el neocestriado juega un papel importante en la adquisición y el mantenimiento de respuestas condicionadas aprendidas, por lo menos aquellas en las cuales es importante la actividad motora (Prado-Alcalá, 1985). Estas aseveraciones han sido establecidas debido a la elaboración de una gran variedad de experimentos, así por ejemplo, se ha demostrado que las lesiones mecánicas, electrolíticas (Glick et al., 1973; Winocur, 1974) o por la inyección local de anestésicos, cloruro de potasio (Prado-Alcalá et al., 1973, 1980) o neurotoxinas (Sanberg et al., 1978) en el núcleo caudado producen un marcado impedimento en la consolidación y recuperación de asociaciones aprendidas instrumentalmente. (Oberg y Divac, 1979; Bermúdez Rattoni et al., 1986).

En los paradigmas de prevención tanto activa como pasiva, se involucra un componente clásicamente condicionado, el stress. En el caso de la prevención activa, el animal necesita "hacer algo"

para evitar una condición nociva, mientras que en la prevención pasiva, necesita "no hacer" para evitarlo. Utilizando estos paradigmas, Myers et al., demostraron, en 1968, que la estimulación eléctrica bilateral del estriado provoca una interferencia en el aprendizaje de prevención pasiva. Sin embargo, las ratas con lesiones en el cuerpo estriado ejecutan tareas de discriminación luz-obscuridad, sin dificultad, esto último, probablemente es debido a que la respuesta adquirida no se opone a otra previamente aprendida (Kirkby, 1969). Winocur (1974), encontró que existe una heterogeneidad funcional en el núcleo caudado, ya que los animales con lesiones en la porción posteroventral, o bien, en la porción anterodorsal, presentan deficiencias en el aprendizaje de prevención activa o pasiva respectivamente, y propone que las porciones posterior y ventral están involucradas en la orientación espacial, mientras que las porciones anterior y dorsal pueden diferenciarse por su participación en el control inhibitorio de diversos tipos de conductas.

Otros experimentos han dado la clave de los posibles eventos neuroquímicos que se producen en el núcleo que nos ocupa, y que tienen que ver con el establecimiento del aprendizaje, así por ejemplo, el bloqueo colinérgico del núcleo caudado induce un estado de amnesia retrógrada poco después del entrenamiento en la prevención pasiva (Prado-Alcalá, et al., 1977, 1984; Haycock et al., 1973). La amnesia también puede producirse cuando

bloqueadores colinérgicos como la atropina o escopolamina se aplican al estriado de animales que han sido entrenados en una tarea de prevención activa. Por otro lado, la estimulación de los receptores de acetilcolina en este núcleo producen un incremento en la retención de diversas tareas instrumentales (Fernández et al., 1977).

Como ya hemos mencionado, la actividad colinérgica del estriado está mediada por interneuronas (Butcher y Butcher, 1974), funcionalmente conectadas a neuronas aferentes dopaminérgicas y a neuronas eferentes intrínsecas gabaérgicas (Côté y Crutcher, 1985). Entonces se puede esperar que estas neuronas puedan contribuir al establecimiento de la memoria, ya que los cambios en su actividad química pueden llevar a cabo cambios en la actividad de interneuronas colinérgicas. De hecho, se ha postulado que puede haber modificaciones en la memoria debidas al desbalance en la actividad del sistema nigro-estriatal, producido por las alteraciones de la actividad de cualquiera de sus componentes.

Como hemos dicho, las lesiones de la vía dopaminérgica nigro-estriatal, que afectan la actividad motora, han sido relacionadas directamente con la enfermedad de Parkinson; además, algunos de los síntomas de la corea de Huntington, como la hiperactividad, pueden atribuirse a una disfunción de los neurotransmisores del estriado (Divac et al., 1978). Asimismo, se han encontrado serios defectos en la adquisición en la habilidad motora (aprendizaje) en pacientes con las enfermedades de

Parkinson y Huntington (Heindel, et al., 1988), que al parecer no están directamente relacionados con la disfunción motora.

TRANSPLANTES DE TEJIDO CEREBRAL

Hasta hace algunos años, se consideraba que el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos era una estructura estática; se pensaba que las neuronas dañadas eran incapaces de volver a crecer o de llevar a cabo cambios estructurales significativos como para reestablecer su función. Si se observaban signos de recuperación después de un daño al cerebro, se atribuía a la capacidad del tejido de desarrollar hipersensibilidad o de utilizar vías alternas (Teuber, 1974). Hoy en día, es aparente que el SNC puede desarrollar procesos que promueven la recuperación funcional después del daño al sistema; por ejemplo en respuesta a la denervación, las fibras no dañadas son capaces de producir rebrotes axonales (sprouting) y formar nuevas sinapsis para reemplazar así la pérdida, y en algunos casos, para participar en la recuperación funcional (Cotman et al., 1981). Sin embargo, en algunos casos el daño es tan severo que es necesario suplementar el proceso natural para promover la recuperación. Los trasplantes han sido utilizados en una gran variedad de modelos como mediadores de recuperación anatómica y funcional (Björklund y Stenevi, 1984; Gash et al., 1985; Freed et al., 1985).

El estudio de los trasplantes de tejido cerebral se remonta a finales del siglo pasado (ver tabla 1). Los primeros trabajos sobre trasplantes eran descriptivos, y tenían por objetivo

estudiar la capacidad de los implantes para sobrevivir en un medio distinto al natural y si el cerebro era un ámbito adecuado para el desarrollo y crecimiento del tejido transplantado (Dunnell y Björklund, 1987). Sin embargo, el trabajo de estos pioneros no fue tomado en cuenta, ya que en aquellos tiempos la idea prevaleciente definía al cerebro como un órgano estático, como ya hemos mencionado, además de que muchos de estos trabajos no podían ser reproducidos.

Fue hasta 1969, en que Raisman reportó la primera evidencia ultraestructural de la existencia del crecimiento y ramificación de fibras (sprouting), en el septum desafrentado. Este trabajo, junto con el advenimiento de nuevas técnicas histológicas, trajeron en consecuencia que se considerase la capacidad regenerativa del SNC. Estos eventos marcan el inicio del estudio profundo sobre los trasplantes y su capacidad para promover la recuperación anatómica y funcional del SNC.

De modo subsecuente, los trabajos que se desarrollaron en años posteriores, caracterizaron la técnica de los trasplantes del SNC. De estos trabajos, se implementaron una serie de preceptos críticos para la supervivencia y reproducibilidad de los trasplantes. Básicamente estos preceptos son:

1. El tejido del sistema nervioso central sólo es viable como trasplante cuando el donador está en desarrollo, y mejor si es embrionario. Parece ser que existe un tiempo límite de desarrollo durante el cual debe obtenerse el tejido transplantado. Este

tiempo difiere para cada población de neuronas, y parece corresponder al final de la mitosis, (Seiger, 1985). Aunque Jaeger y Lund (1980) consideran que el éxito del trasplante depende de la capacidad proliferativa de las células del donador.

2. Es necesario seleccionar el sitio del trasplante en el huésped. Debe estar altamente vascularizado y proveer de soporte y rápida incorporación con vasos y circulación del fluido cerebro espinal del huésped. Existen cavidades naturales, como los ventrículos, la cámara anterior del ojo, que llenan estos requisitos. Alternativamente, se puede elaborar artificialmente una cavidad que reciba al implante; esta cavidad se revasculariza al cabo de un tiempo (generalmente en 15 días) y constituye un sitio adecuado para sostener el crecimiento del tejido, ya que los vasos sanguíneos que recubren la cavidad dotarán al trasplante con el aporte sanguíneo necesario para su supervivencia (Stenevi et al., 1976).

3. Las reacciones inmunológicas desencadenadas por los trasplantes no afectan el desarrollo de los mismos, esto es, el cerebro huésped acepta al tejido extraño a diferencia de lo que ocurre con trasplantes de cualquier otro órgano (Stenevi et al., 1976). El concepto del cerebro como un sitio "inmunológicamente privilegiado", cuyo origen se remonta a los trabajos de principios de siglo de Shirai (1921), se sabe hoy en día que es parcial (Mason et al., 1986; Freed et al., 1988). En algunos casos en el

que el donador y el receptor son de diferente especie, se puede observar rechazo del tejido y solamente con la utilización de drogas inmunosupresoras es posible evitar tal fenómeno (Brundin et al., 1983).

Los tres preceptos básicos anteriores publicados por Stenevi et al., en 1978, han sido confirmados por innumerables trabajos que se han elaborado hasta ahora . Así, se han desarrollado una serie de técnicas para transplantar tejido cerebral y estudiado las condiciones necesarias tendientes a optimizarlas. (para una revisión exhaustiva ver Björklund y Stenevi, 1984, 1985).

De estos trabajos, podemos resumir que el crecimiento y organización intrínseca del tejido transplantado en el SNC, puede variar en función de una gran variedad de parámetros: diferencias en el proceso de disección, en el volumen de tejido transplantado, en el estadio de diferenciación en el que se encuentran sus células y en las propiedades del sitio donde el tejido será colocado.

Además de los estudios relacionados con la supervivencia y el desarrollo de los trasplantes, estos han sido analizados desde otro punto de vista: su funcionalidad. La estrecha relación existente entre el huésped y el trasplante se manifiesta funcionalmente en la conducta del animal receptor de diversas maneras. Una gran cantidad de modelos de estudio han revelado diversos mecanismos mediante los cuales es posible que los trasplantes modifiquen la conducta del animal receptor (Dunnet y

Björklund, 1987; Björklund et al., 1987; Freed et al., 1988; Cotman y Kossiak, 1988).

Durante mucho tiempo se asumió que los trasplantes promovían la recuperación conductual restaurando los circuitos dañados, pero esto no ocurre necesariamente para todos los modelos. Los trasplantes pueden actuar en diferentes niveles para estimular la recuperación funcional. Por ejemplo, los trasplantes no sólo pueden reconectar la circuitería interrumpida, sino que también pueden proveer de los neurotransmisores faltantes, para facilitar la operación de los circuitos existentes; también pueden estimular la vascularización, remover sustancias tóxicas o promover la sobrevivencia y el crecimiento por medio de interacciones neurotróficas entre el huésped y el trasplante.

Para entender los mecanismos involucrados en la recuperación, deben ser evaluadas cada una de estas contribuciones. En general se postulan tres tipos de mecanismos, no excluyentes uno del otro y de los que hay gran cantidad de evidencias (Fig. 5)

- Reestablecimiento de conexiones: diversos autores han observado una integración completa del trasplante y el huésped por medio del establecimiento de conexiones recíprocas entre el anfitrión. (McLoon y Lund, 1980; Victorin et al., 1980). Se ha encontrado que las reconexiones se efectúan de manera precisa cuando se utiliza un receptor en desarrollo que haya sido desferentado por medio de una lesión, aunque la reconectividad recíproca puede observarse también en huéspedes adultos (Dunnet y

Björklund, 1987).

Otro aspecto de la reconectividad es la acción que ejercen las proyecciones del trasplante hacia el huésped. Al respecto, la liberación de neurotransmisor tónica y autorregulada de la neurona presináptica (del trasplante), puede ser suficiente para que las neuronas postsinápticas sean nuevamente funcionales (Björklund et al., 1987; Dunnett y Björklund, 1987; Freed et al., 1985).

- Interacciones tróficas: se conoce que los trasplantes cerebrales contienen factores tróficos, los cuales pueden actuar *in vitro* promoviendo la supervivencia de las células nerviosas, el crecimiento de neuritas así como la diferenciación de neuronas periféricas y del SNC. (Cotman y Kesslak, 1988). Algunos autores sugieren que ciertos tipos de factores tróficos (como los que promueven la supervivencia) se producen como consecuencia de una lesión y que estos contribuyen a la supervivencia y el crecimiento de los trasplantes (Nieto-Sampedro y Cotman, 1986). Parece ser que el cerebro responde al daño produciendo factores tróficos, lo que incrementa la supervivencia neuronal y promueve el crecimiento de neuritas (Cotman y Nieto-Sampedro, 1984; Needels et al., 1985); esta actividad es mayor en las áreas que rodean a la lesión, pero inclusive puede ser muy alta en áreas denervadas distantes a la lesión; por ejemplo, la actividad trófica inducida por la lesión de la porción retrohipocámpal, promueve la supervivencia de los trasplantes colinérgicos estriatales (Manthorpe et al., 1983) o por la inyección de extractos de cerebro lesionado (Nieto-Sampedro

et al., 1984). Aún más, la lesión específica de un sitio del cerebro puede producir factores que beneficien más a unas células que a otras (Gibbs et al., 1988).

Liberación de hormonas o de neurotransmisores: se postula que las células que componen al transplante liberan factores humorales hacia el huésped (neurotransmisores u hormonas) y que las neuronas sensibles a las moléculas expulsadas recuperan su actividad. Por ejemplo, los trasplantes intraventriculares del área preóptica, que contienen altas cantidades de hormona liberadora de gonadotropinas, son capaces de establecer funciones gonadales normales en sujetos con deficiencias genéticas en la producción de tal hormona (Gibson et al., 1985). Por otro lado algunos autores han reportado la recuperación del control motor de ratas con lesiones en el sistema nigro-estriatal, debido a trasplantes de sustancia nigra o de células de la médula adrenal, las cuales se piensa que ejercen su acción por medio de la liberación de dopamina (Perlow et al., 1979; Freed et al., 1981; Dunnett et al., 1983).

La recuperación funcional observada en los distintos modelos no puede ser explicada por uno solo de los mecanismos descritos anteriormente. De hecho en la mayoría, si no es que en todos los casos, el reestablecimiento de una función, es el resultado de la acción de varios factores. La importancia de cada factor en la recuperación funcional dependerá en última instancia, del modelo experimental que se esté abordando.

TABLA I

HISTORIA DE LOS TRANSPLANTES

- 1890 - W.G. THOMPSON (EUA)
Primer intento de trasplante de tejido adulto a la corteza cerebral (gato, perro).
- 1907 - G. DEL CONTE (ITALIA)
Intento de trasplante de tejido embrionario no cerebral de perros adultos.
- 1911 - F. TELLO (ESPAÑA)
Primer trasplante exitoso de tejido nervioso periférico a la corteza cerebral (en conejo).
- 1917 - E. DUNN (EUA)
Primer trasplante exitoso de corteza cerebral de una rata neonatal a la corteza de otra neonatal (el trasplante mostró cierto grado de laminación).
- 1940 - W.E. LE GROS CLARK (INGLATERRA)
Primer trasplante exitoso de tejido cortical fetal a corteza de neonatos (en conejo y en ratas).
- 1961 - R. ALVAREZ-BUYLLA (MEXICO)
Primer trasplante de glándula suprarrenal en la silla turca de perro, previa extracción de la hipófisis.
- 1970 - L. OLSON ET AL (SUECIA), G.D. DAS ET AL (EUA) Y BJORKLUND ET AL (SUECIA)
Primeros trasplantes exitosos de tejido fetal en diversas áreas del S.N.C. de ratas y conejos adultos.
- 1980 - W. FREED (EUA)
Primer trasplante de médula adrenal al ventrículo lateral con recuperación funcional (en ratas).
- 1984 - O. OLSON ET AL (SUECIA)
1986 - I. MADRAZO ET AL (MEXICO)
Primeros trasplantes de médula adrenal al cerebro humano.
- 1985 - VARIOS AUTORES
Biología Molecular aplicada en trasplantes cerebrales

FIGURA 3

En este esquema se ilustran los mecanismos de acción propuestos para la inducción de la recuperación funcional mediada por transplantes. Abreviaturas empleadas:

NGF Factor de crecimiento neuronal
FGF Factor de crecimiento de fibroblastos
EGF Factor de crecimiento epidérmico
Ach Acetilcolina
GABA Acido gama-amino-butírico

TRANSPLANTES

¿ CÓMO ACTÚAN EN LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL ?

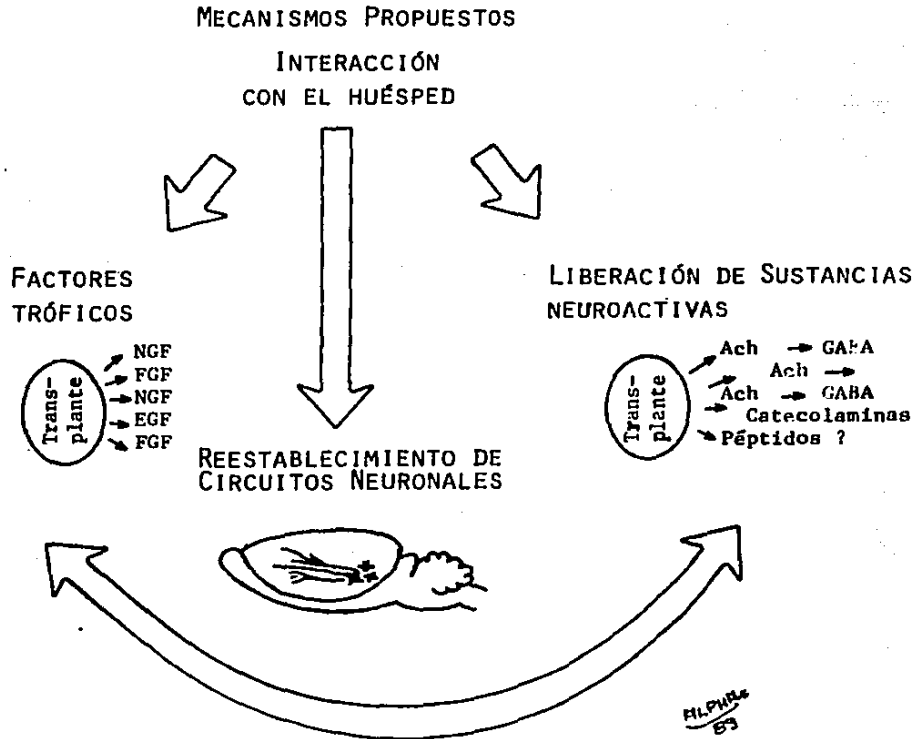


FIG. 5

TRANSPLANTES AL ESTRIADO

Los trasplantes de tejido fetal en el estriado lesionado constituyen una serie de modelos por medio de los cuales es posible el estudio adecuado, tanto de la incorporación funcional del tejido neural embrionario como del funcionamiento del neocestriado.

Como ya hemos mencionado, las lesiones producidas con 6-OHDA producen la destrucción selectiva de neuronas dopaminérgicas. La aplicación unilateral de dicha neurotoxina produce una asimetría sensorimotora, conocida como conducta de giro, la cual puede ser manipulada a nivel sináptico por medio de diferentes fármacos. Utilizando este modelo, en 1979, dos grupos independientemente demostraron que los trasplantes de tejido neural producen efectos sobre el comportamiento de animales lesionados. Por un lado, Perlow et al., mostraron que los trasplantes de sustancia nigra dentro de los ventrículos de ratas con lesiones unilaterales con 6-OHDA, pueden reducir el número de giros en aproximadamente un 40%. Por otro lado, Björklund y Stenevi, encontraron que trasplantes similares depositados en una cavidad cortical, limítrofe con el estriado dorsal, proveen de una compensación completa de la asimetría creada por 6-OHDA. Estos estudios han sido replicados por varios autores (Freed, 1983; Freed et al., 1980; Dunnett et al., 1983). Freed et al., en 1981, demostraron

que las deficiencias debido a lesiones con 6-OHDA pueden reducirse por medio del trasplante de células de la médula adrenal. Estos resultados han sido utilizados como modelo de aplicaciones clínicas, como tratamiento en la enfermedad de Parkinson (Olson, 1984; Madrazo et al., 1987).

Por otra parte, se ha demostrado que las inyecciones de amino-ácidos neurotóxicos (ácidos kainico e iboténico) en el neocórtex induce cambios neurodegenerativos, bioquímicos y con alteraciones en el comportamiento, de tal forma que han sido considerados como un modelo experimental de la Corea de Huntington. Estas toxinas destruyen las neuronas intrínsecas del estriado y de sus proyecciones eferentes en el globus pallidus y la sustancia nigra en su parte reticular (Coyle y Schwarz, 1978; McGeer y McGeer, 1978), además producen impedimentos funcionales tanto en comportamientos no condicionados (v. gr. hiperactividad locomotora) como en condicionados (v. gr. tareas de alternación en un laberinto en T). Schmidt et al., (1981). fueron los primeros en demostrar la viabilidad del tejido estriatal transplantado en ratas previamente lesionadas en forma bilateral con AK. Después se demostró que la hiperactividad inducida por lesiones bilaterales con este mismo neurotóxico puede ser revertida por trasplantes de estriado fetal (Deckel et al., 1983; 1985a; Dunnett et al., 1988; Isacson et al., 1984, 1986). Estudios subsecuentes demostraron que estos trasplantes también pueden inducir la recuperación de la capacidad del aprendizaje en la tarea de alternación en el

laberinto en T, para ratas con lesiones en el estriado. A este respecto, Isaacson et al., (1980), encontraron que la recuperación en este tipo de tareas se correlaciona con el tamaño del trasplante dentro del neocortico, y que el tejido trasplantado fuera de estriado (en el globus pallidus), que es el primer blanco de las eferencias del neocortico, no reduce las deficiencias de tales lesiones (Dunnett et al., 1989). En un trabajo paralelo, Deckel et al., (1980), reportaron que la densidad de células dentro del trasplante, esta correlacionado con el desempeño de los sujetos en la tarea del laberinto en T,, aunque en este estudio la diferencia en el desempeño en el laberinto entre los sujetos trasplantados y los lesionados no fue significativo.

Algunos autores consideran que la recuperación de las deficiencias en las tareas de aprendizaje es debido a la organización funcional normal del neocortico. Se sabe que esta estructura provee de un alto nivel de control de los sistemas motores piramidal y extrapiramidal, efectuada por las vías de proyección al globus pallidus y a la sustancia nigra pars reticulata. El estriado a su vez recibe entradas, topográficamente organizadas de toda la corteza, y por lo tanto, parece dar lugar a un sitio de convergencia de los procesos corticales de asociación y motosensorial que actúan sobre el sistema motor, bajo el control regulatorio y sensorial de las eferentes que provienen del núcleo intralaminar del tálamo, de la sustancia nigra y del núcleo del rafe (Nauta y Domesick, 1984).

Así pues, mientras algunos efectos de las lesiones estriatales como la hiperactividad locomotora, pueden ser considerados como una simple desinhibición de las eferentes estriatales, otros pueden ser atribuidos a la ruptura o desconexión de sistemas neurales de integración. Así, la cabeza del núcleo caudado es parte de un sistema frontal cortical para el control de una variedad de funciones, incluyendo aquellas involucradas en el aprendizaje de algunas tareas; de tal manera las lesiones de la corteza frontal, del neocórtex o de la aferentes dopaminérgicas a estos sitios, impiden un buen desempeño en tales tareas (Rosvold, 1968; Divac et al., 1967; Dunnett e Iversen, 1981).

Asimismo para Dunnett et al., (1988), la habilidad del tejido neural transplantado, para restaurar las capacidades funcionales en una tarea de aprendizaje tal como en el laberinto en T, y la observación de que el trasplante es efectivo sólo cuando es implantado en un sitio homotópico y no ectópico, sugiere que en su modelo, los trasplantes deben estar reconstituyendo el acceso cortical a sistemas de control motor. Al respecto, algunos otros autores (Sanberg y Hanault, 1986) han observado que los implantes de estriado que están dentro del ventrículo lateral no producen recuperación en las anomalías locomotoras; en contraste, sólo parece haber efectividad del trasplante cuando el tejido parece estar penetrando el estriado huésped (Dunnett et al., 1988). Aunque, como ya hemos puntualizado, Perlow (1970) y Freed (1983),

demostraron que los tranplantes de sustancia nigra o de médula adrenal colocados en ventriculo, resultaron ser efectivos.

Por otro lado, se ha acumulado evidencia que indica, que el tejido transplantado estriatal puede recibir reaferentación de los sistemas neurales del huésped y que establecen nuevas conexiones con blancos apropiados (Pritzel et al., 1986; Clarke et al., 1988; Victorin et al., 1989). Sin embargo, a pesar de que se ha observado que estas entradas masivas desde los sistemas dopaminérgicos del huésped pueden establecerse dentro de los tranplantes, un estudio reciente sugiere que los efectos funcionales de los tranplantes son independientes de la regulación dopaminérgica (Deckel et al., 1986b).

SECCION EXPERIMENTAL

TRABAJO I

**DIFFERENTIAL RECOVERY OF PASSIVE AVOIDANCE AND MOTOR ACTIVITY BY
STRIATAL AND SUBSTANTIA NIGRA FETAL GRAFTS.**

Pifia, A.L. and Bermúdez-Rattoni, F.

Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México, D.F.

Key Words: Intra-striatal Grafts; Functional Recovery; Learning.

Please send all correspondence regarding this manuscript to:

**Dr. Federico Bermúdez-Rattoni
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Apdo. Postal 70-600
04510 México, D.F.
Tel: (905) 550-5215 x 4889
FAX: (905) 548-0387**

INTRODUCTION

Over the last years, numerous studies have demonstrated the capacity of embryonic neural tissues to survive transplantation to the adult mammalian brain. Moreover, it has been shown the considerable capacity of the embryonic tissues to reinnervate and become innervated by the host nervous system (Bjorklund and Stenevi 1979, 1984; Escobar, 1989).

The graft-induced functional recovery can be attributable to the reconstruction of a damage neural circuitry in the host brain. However, it has become apparent, that in different model the functional recovery can be explained by other mechanisms, such as, acute trophic influences over the host tissue (Cotman and Kesslak, 1988; Freed et al 1985) or diffuse release of neurochemicals (Dunnett and Bjorklund, 1987).

The striatum is probably the most extensively explored region for combined morphological and functional studies of intracerebral grafted neurons. Blocks or dissociated cell suspension fetal striatal tissue had been shown to survive and differentiate into the caudate-putamen of adult striatal damage rats (Sandberg et al 1986; Isacson et al., 1986).

It is well known that striatal lesions produced neurogenerative, biochemical and behavioral changes (Coyle and Schwarcz, 1976). One of the most conspicuous behavioral alteration is in the locomotor activity, i.e. enhanced motor activity. This kind of alteration has been employed as an animal model for degenerative disorders such as Huntington disease (Dunnett,

1988). It also has been reported that interference of normal striatal activity, by means of electrolytic lesions (Glik and Greenstein 1973; Winocur, 1974), electrical stimulation (Wyers and Deadwyler, 1971, 1973), potassium chloride administration (Prado-Alcalá et al 1980), injections of neurotoxic chemicals (Sanberg et al 1978) and microinjections of anticholinergic drugs, lead to a marked impairment in the acquisition of conditioned responses such as Passive Avoidance or autoshaping conditioning (Bermúdez-Rattoni et al 1986; Prado-Alcalá 1985).

In this study, we demonstrated that striatal grafted tissue into striatal lesioned rats produced a recovery in conditioned learning task (Passive Avoidance) and only partially recovered motor activity. Meanwhile, the mesencephalon grafted tissue recovered only motor activity but not Passive Avoidance conditioning.

Male Wistar rats, weighing 250-290 g, were randomly assigned to one of two groups. Two large bilateral electrolytic lesions were made under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg) to encompass the striatum (stereotaxic coordinates: AP=-0.5, L=±3.5, H=-4.5 and -6.5, from skull level). Following post-operative recovery (8 days), the animals were measured for motor activity and for passive avoidance training. The animals were measured during two hours, for two days on motor activity Stoelting boxes (model 31402) with normal sensibility. Step-through passive avoidance were conducted in a two compartment box (30x40x15 cm) divided by a sliding door. One of the compartment (safe) was illuminated by a 40W light bulb, in this compartment rats were placed for training and testing sessions. The other compartment was not

illuminated and had two metal floor, through which a brief electric shock were delivered. During the acquisition session, the animals were placed in the illuminated compartment and remained for 30 sec. After this period the rat was allow to enter into the dark compartment. The time the rat took to move from illuminated to dark compartment was written down (latency). As soon as the four paws of the rat were inside the dark compartment, the door was closed and a 0.8 mA DC footshock was delivered for 3 sec. Then the animal was allow to return to the safe compartment. Twenty four hours later the same procedure was followed except that the footshock was not delivered (test). Two more extinction tests were performed.

Fifteen days after the lesion session, the lesioned animals were divided in 3 groups: one group received striatal homotopic grafts (CNst; n=11), the other group received heterotopic (sustantia nigra) grafts (CNsn; n=10) and the other group remained lesioned as a control group (CNlx; n=10). 15-16 day-old fetuses were removed from the abdominal cavity of pregnant rats, the fetal brains were taken, and the striatum and/or ventral mesencephalon was taken under a stereoscopic microscope. The block of tissue were about 3 mm³, and were stereotaxically placed throughout a Hamilton microsyringe (100 ul), into the previously lesioned striatum. After 8 weeks of recovery, the four groups of rats were retrained for passive avoidance and measured for motor activity again.

At the end of the experiment all the rats were sacrificed and perfused through the ascending aorta with a saline solution

(0.15M) followed by a 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde solution in phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4, 0.1 M and 0.15 M NaCl). The brains were immersed for two hours in the same fixation solution and then immersed in a 20% sucrose in PBS for 24 hr prior sectioning. Serial sections were cut on a freezing microtome at 40 um thickness, collected in PBS and processed for visualization on either the following techniques: Cresyl Violet: Standard procedure for Cresyl violet staining was used for each slide. Acetylcholinesterase histochemistry (AChE): slide mounted sections were stained according to a modified Paxinos and Watson's protocol (1987). The slides were incubated overnight with 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0, 4 mM copper sulphate, 4 mM glycine 4 mM acetylthiocholine iodide and 0.1 mM ethopropazine. After incubation the slides were immersed into a developing solution (1% sodium sulphide pH 7.5) for 10 minutes. Then the slides were allowed to dry and mounted with permount.

Immunocytochemistry Method: TH (tyrosine hydroxylase) were visualised using primary antibodies (from Eugene Tech International, Inc.) at a dilution of 1:500. The sections were incubated during eight days and then developed with a rabbit IgG avidin-biotin immunoperoxidase Kit (Vector Laboratories). The tissue was mounted with coverslips and Permount.

Behavioral:

Table 1. summarizes the pre-graft results for motor activity and passive avoidance conditioning for all the groups. Simple ANOVA was done on means for number of counts in two hours for two days. There were significant differences between group F(1,

58)-4.13; $p = 0.044$. The control group showed a mean of 5600 counts, meanwhile the lesioned group showed a significant increment in the number of count in the two hour period ($p = 0.05$). The results pre-graft for passive avoidance can be seen in the Table 1. During the acquisition session there were not significant differences among groups $F(1, 49)=1.4$. During the first test trial there were differences among groups ($F(1,49)=50$ $p = 0.001$). As expected, the control group showed high latency and the lesioned group showed a significant lower latencies ($p = 0.05$).

INSERT TABLE 1 ABOUT HERE

The post-graft ANOVA comparisons (Fig. 1a) for motor activity revealed that there were significant differences among the groups ($F(3, 57)=9.64$, $p = 0.001$). The groups that received the striatal graft (CNcn), and which remained lesioned (CNlx) showed significant enhanced motor activity when compared with the control group (CON). Meanwhile the substantia nigra-graft group (ST) showed a similar number of counts and there was significant difference from the CON group. For passive avoidance, the ANOVA comparisons for the acquisition day revealed that there were no significant differences between the groups $F(3, 50)=2.27$; $p = 0.092$). Although, the group CON showed a higher latency during the acquisition trial. Fig 2b shows results of the first trial after one acquisition on passive avoidance. ANOVA revealed significant differences among groups $F(3, 50)=2.73$; $p = 0.05$. The CON group and animals that received striatal graft (CNst)

showed the higher latency and there were no differences among them. The groups that remained lesioned (CNix) and the group receiving substantia nigra (ST) graft showed a significant lower latencies than the groups CON and CNcn ($p < 0.05$).

INSERT FIG. 1 ABOUT HERE

Histological examination revealed that the ST lesions involved most of the dorsal area of the striatum, and the extension of the lesion were on average 2.0 mm in the dorsoventral plane and 3.0 mm in the anteroposterior plane, always the ventricles appear to be enhanced. The homotopic brain transplants appeared to be healthy and placed in the appropriate target area of the host brain (Fig. 2a). The cholinesterase histochemistry had a strong reaction in the intact striatum. Patches of cells could be observed within the graft positive to the AChE histochemistry (Fig. 2a3b). Immunoreaction for TH was observed in fibers within the host tissue and in the border between graft and host tissue (2c and 2d).

The heterotopic (substantia nigra) grafts appeared also healthy and well placed, but they were less extensive than the striatal grafts (see Fig. 2e). Cholinesterase histochemistry was negative within these grafts (Fig. 2f), positive immunoreaction for TH was evident in cell bodies and fiber within the substantia nigra grafts (Fig 2g, 2h).

INSERT FIG. 2 ABOUT HERE

These results demonstrate that intrastriatal grafts taken from fetal striatum, but not from ventral mesencephalic tissue were able to ameliorate the passive avoidance learning deficits, in animals with large electrolytical lesions in to the striatum. In contrast, the enhanced motor activity were reestablished to normal values by the sustancia nigra but not by striatal fetal grafts. The histological findings, revealed patches of cells positive to AChE histochemistry into the striatal graft tissue, meanwhile the sustantia nigra grafts showed immunoreactive TH cells. These results suggest that some tissue specificity is needed for each kind of behavioral recovery. Similar results have been found in other areas and with different tasks (Stein et al transplants into the gustatory neocortex and did not, find any behavioral recovery in taste aversion conditioning (Escobar et al., 1989).

On the other hand, the place where the graft is located seems to be another important variable for the behavioral recovery. Several studies have reported recovery of motor activity imbalances by striatal grafts in the striatum (Sanberg et al 1986; Deckel et al., 1983; Isacson et al 1984; 1986). However, when the striatal grafts were located outside the striatum; as in the globus pallidus there were less behavioral recovery after four months after transplantation (Isacson et al., 1986). In this regard, other authors have found failure in functional recovery when the wholly striatal grafts are within lateral ventricle (Sanberg and Hanault, 1986). In our results, the

striatal grafts seems to be growing outside the remaining host striatum (See Fig 2 a). Meanwhile, the satantia nigra grafts were always found inside the host striatal tissue (Fig. 2b). This findings indicate the possibility that for recovery of motor activity, the place where the grafts are located is an important factor. Nevertheless, for recovery of learning tasks the graft location seems not to be a crucial factor (Isacson et al., 1986; our own results).

The present findings, indicate that neural grafts taken from different regions of the brain produced differential functional effects. These effects could be dependent on different mechanisms of action; i.e. diffuse release of neurochemicals, trophic influences of the host brain or reconstruction of damaged circuitry (Freed et al 1985; Dunnet and Bjorklund, 1987).

Other studies have demonstrated that the striatal cholinergic activity is highly involved in the learning processes (see Haycok et al., 1973; Prado et al., 1987; Bermudez Rattoni et al., 1986; Sandberg 1984). In this regard, it has been shown that cholinergic blockade of the striatum leads to marked impairment in the retention of previously learned behaviors maintained by positive (Prado-Alcala y col., 1979; Prado Alcala et al., 1985) and negative reinforcers (Prado-Alcala et al., 1984). On the other hand, cholinergic stimulation of this structure produces significant improvements of the same type of behaviors (Prado Alcala y Cobos 1979; Prado Alcala et al., 1984). Our results indicated that cholinergic striatal grafts produced differential behavioral recovery for passive avoidance but not

for the enhanced motor activity. In contrast mesencephalic grafts were unable to recover the learning task but did recover the enhanced motor activity. This suggests that some neneurotransmitter tissue content could be involved in the behavioral recovery for motor activity and passive avoidance learning task.

BIBLIOGRAPHY

1. Bermúdez-Rattoni, F., Mújica-González, M., Prado-Alcalá, R. (1986). *Pharmac. Biochem. & Behav.* Vol. 24: 715-719.
2. Bjorklund, A., Stenevi, U. (1979). *Physiol. Rev.*, 59: 62-100.
3. Bjorklund, A., Stenevi, U. (1984). *Annu. Rev. Neurosci.* 7: 279-308.
4. Cotman, Kesslak (1988). *Progress in Brain Res.* Vol. 78: pp.
5. Coyle, J.T., Schwarcz, R. (1976). *Nature* Vol. 263: 244-246.
6. Deckel, A.W., Robinson, R.G., Coyle, S.T., Sanberg, P.R. (1983). *Eur. J. Pharmacol.* 93: 287-288.
7. Deckel, A.W., Moran, T.H., Coyle, J.T., Sanberg, P.R., Robinson, G. (1986). *Brain Res.* 365: 249-258.
8. Deutch et al (1985).
9. Dunnett, S.P., Bjorklund, A., Schmidt, R.H., Stenevi, U., Iversen, D. (1983). *Acta Physiol. Scand.* 522: 29-47.
10. Dunnett, S.B., Bjorklund, A. (1987). *J. Exp. Biol.* 132: 265-289.
11. Dunnett, S.B., Isacson, O., Irinathsinghi, Clarke, D.J. y Bjorklund, A. (1988). *Progress in Brain Research* 78: 39-45.
12. Escobar, M., Fernández, J., Guevara-Aguilar, R., Bermúdez-Rattoni, F. (1989). *Brain Res.* 151: 523-532.
13. Freed, W.S., De Medinaceli, L., Wyatt, R.J. (1985). *Science* 227: 1544-1552.
14. Glick, S.D. Greenstein, S. (1973). *J. Comp. Physiol. Psychol.* 82: 188-194.

15. Isacson, O., Brundin, P.A.T., Kelly, F.H., Gage, F.H., Bjorklund, A. (1984). *Nature* 311: 458-460.
16. Isacson, O., Dunnett, S.B., Bjorklund, A. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2728-2732.
17. Prado Alcalá, R.A., Bermúdez-Rattoni, F., Velázquez Martínez, D., Bacha, M.G. (1978). *Life Sci.* 23: 889-896.
18. Prado-Alcalá, R.A., Cepeda, G., Verduzco, L., Jiménez, A., Vargas-Ortega. (1984). *E. Neurosci. Lett.* 51: 31-36.
19. Prado-Alcalá, R.A. and Cobos-Zapalaín, G.G. (1979). *Neurosci. Lett.* 14: 253-258.
20. Prado-Alcalá, R.A., Fernández-Samblancat, M., Solodkin-Herrera, M. (1985). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22: 243-247.
21. Prado-Alcalá et al (1987).
22. Pritzel, M., Isacson, O., Brundin, P., Wiklund, L. y Bjorklund, A. (1986). *Exp. Brain Res.*, 65: 112-126.
23. Sanberg, P.R., Hanault, M.A. (1986). *Soc. Neurosci. Abst.* 12: 563.
24. Sanberg, P.R., Henault, M.A., Deckel, A.W. (1986). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 25: 297-300.
25. Sanberg, P.R., Lehman, J., Fibiger, H.C. (1978). *Brain Res.* 149: 546-551.
26. Sanberg, K., Sanberg, P.R., Hanin, I., Fisher, A., Coyle, J.T. (1984). *Behav. Neurosci.* 98: 162-165.
27. Stain, D.G., Finger, S. and Hat, T., (1983). *Behav. Neurol. Biol.* 37: 185-222.
28. Wictorin, K., Isacson, O., Fischer, W., Nothias, F., Peschanski, M., Bjorklund, A. (1988). *Progress in Brain Research* 78: 55-60.

29. Victorin, K., Simerly, R.B., Isacson, O., Swanson, L., Bjorklund, A. (1989). *Neuroscience* 30(2): 313-330.
30. Wyers, E.J., Deadwyler, S.A. (1971). *Physiol. Behav.* 6: 97-103.
31. Wyers, E.J., Deadwyler, S.A., Hirasuna, N., Montgomery, D. (1973). *Physiol. Behav.* 11: 809-819.

TABLE 1. PREGRAFT RESULTS

ANIMALS	MOTOR ACTIVITY	
	counts in 2 hrs. (+-SEM)	
	(x 1000)	
CONTROLS	5.6 ± 1.5	
LESIONED	9.3 ± 0.97	

	PASSIVE AVOIDANCE	
	latency in sec acquisition	in sec (+-SEM) test
CONTROLS	47 ± 27	533.8 ± 46.6
LESIONED	18 ± 20	*121.3 ± 34.9

p 0.05

This table shows the analysis of pregraft results for motor activity (the upper part of the table) and for Passive Avoidance (lower part of the table). Electrolytical striatal lesions induce hiperactiviy and impair learning.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The graphs illustrates the postgraft results for motor activity (a) and for passive avoidance task (b) in the control (on) and experimental groups: lesioned (CNLx), with striatal fetal grafts (CNCn) and with substantia nigra grafts (CNSn). Comparison with their own control groups. $p < 0.05$. (ANOVA and Newman-Keuls tests.

a. Postgraft motor activity, measured in counts per 2 hours shows significant recovery in CNSn group, meanwhile lesioned and CNCn groups did not.

b. The graph shows the latency for acquisition (acq) and for test postgraft results in Passive avoidance task. CON and CNCn groups present a significant difference with CNSn and CNLx groups.

Figure 2. Representative coronal sections for striatal (a,b,c and d) and substantia nigra grafts (e,f,g and h).

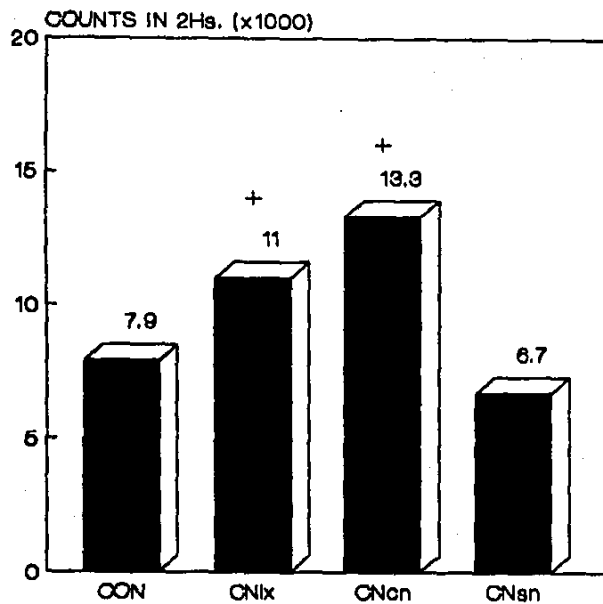
a. Cholinesterase histochemistry in a coronal section of a Striatal graft. Arrows show the border of the graft (g). Observe the strong positive reaction of the host tissue (h) and the patches of cells inside the graft also positive to the histochemistry (x2).

b. A magnification of a. Arrows show cells positive to the AChE histochemistry.

c. Striatal graft with positive fibers immunoreactive for tyrosine hydroxylase (TH) in the border of the graft (arrows) (2x).

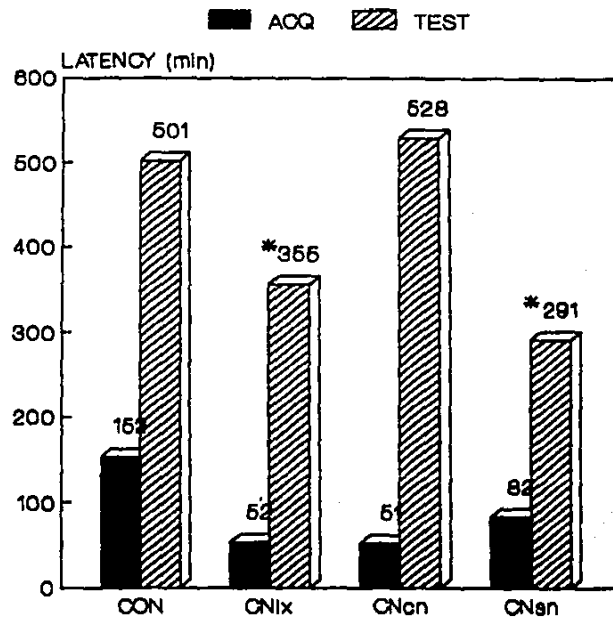
- d. A magnification from c. arrows show the TH positive fibers.
- e. Cholinesterase histochemistry in a substantia nigra graft. Arrows show the border of the graft (g; x2).
- f. A magnification from e. Note the absence of reaction for the AChE histochemistry inside the graft (x20).
- g. TH immunoreaction in cell bodies and fibers in the substantia nigra grafts (x2).
- h. A magnification from g. Arrows show positive immunoreaction for TH in cell bodies in the substantia nigra graft (x10). The square inside shows a magnification of one of this cell bodies (x40).

MOTOR ACTIVITY POST-TRANSPLANT

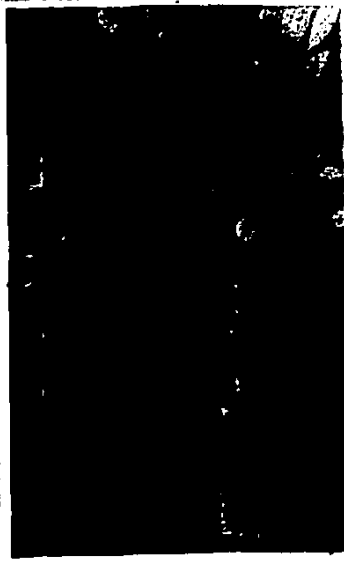
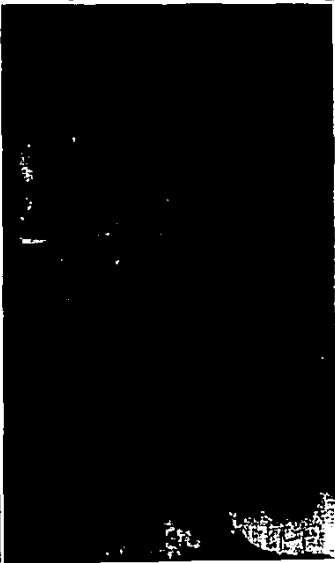
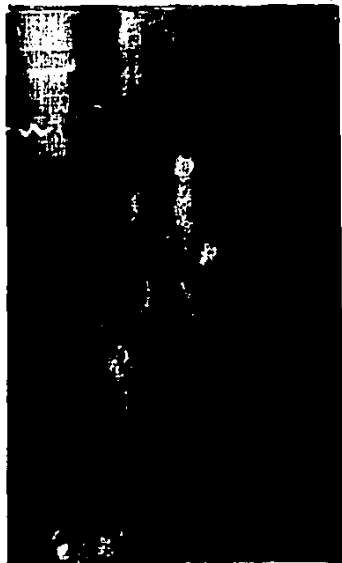
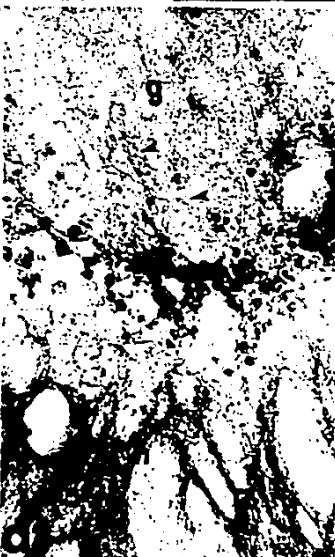
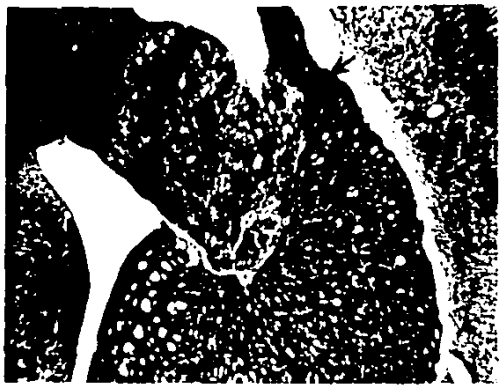


+ p<0.05

PASSIVE AVOIDANCE POST-TRANSPLANT



* p<0.05



TRABAJO II

TRABAJO II

TRANSPLANTES DE CORTEZA FRONTAL

Para proseguir nuestro estudio sobre el papel de los trasplantes en la recuperación funcional del estriado lesionado decidimos iniciar el estudio de trasplantes heterotópicos, con un tejido no involucrado en el sistema nigroestriatal. Utilizamos para el efecto, la corteza frontal, con base en los datos obtenidos en nuestro propio laboratorio. Escobar et al., (1989), demostraron que ratas trasplantadas con tejido heterotópico al sitio de lesión (en este caso, tectum en corteza gustativa) no recuperan la capacidad de adquirir el condicionamiento aversivo a los sabores. Esto indica que existe una especificidad del tejido trasplantado para que se reestablezca la respuesta funcional.

MÉTODOS

Un conjunto de ratas Wistar macho, de aproximadamente 250 g, fue dividido en dos grupos: el control o intacto (CON) y el grupo experimental o lesionado (Cx). Los sujetos de este último grupo fueron lesionados electrolíticamente (2mA durante un minuto) de manera estereotáxica en el área del estriado dorsal anterior Canteroposterior -0.5; lateral +3.5 y vertical a partir de bregma, -5.5 y -5.5, según el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson, (1982). Ocho días después de la lesión, los sujetos fueron sometidos a las mediciones conductuales (actividad motora y prevención pasiva) de igual manera como se describe en el apartado

anterior (trabajo I). Después de 15 días se depositó el tejido proveniente de corteza frontal de fetos de 15 días de gestación en el mismo sitio en que previamente se había elaborado la lesión. Ocho semanas después se reentrenaron los sujetos para el paradigma de prevención pasiva y se realizaron las mediciones pertinentes de actividad motora. En seguida se sacrificaron los animales con una sobredosis de anestésico y se procesó el tejido cerebral de estos sujetos para el estudio histológico (violeta de cresilo) y el histoquímico para AchE.

RESULTADOS

Los resultados conductuales pre y post-transplante pueden observarse en las figuras I y II. La actividad motora pre-transplante indica un aumento en la actividad de los sujetos. Como se esperaba, los resultados post-transplante indican que, no parece existir un cambio significativo con respecto a los resultados pre-transplante (Figura I). En cuanto a la prevención pasiva, puede observarse la deficiencia del grupo experimental para adquirir el aprendizaje, en tanto que el mismo grupo, después de recibir el transplante, no mostró cambios en este comportamiento, manteniéndose diferencias significativas claras con respecto al control.

Los resultados histológicos mostraron una integración adecuada del implante con el huésped (Fig. III), con gran densidad celular dentro del mismo. La reacción histoquímica fue positiva

tanto en células como en fibras dentro del tranplante.

DISCUSION PARCIAL.

Los resultados conductuales muestran que a pesar de existir una buena integración morfológica, ésta no es suficiente para permitir el restablecimiento de las funciones del huésped. Estos resultados sugieren que debe existir cierta especificidad de tejido, o en otras palabras, que de alguna manera el tejido que va ha ser transplantado debe estar relacionado con la función original del tejido o núcleo huésped. Esto concuerda con lo expuesto por Escobar et al., (1989), en donde ratas con transplantes heterotópicos no recuperan la capacidad de desarrollar aversión gustativa. Sin embargo, estos autores muestran que el tejido heterotópico (tectum) no se integra adecuadamente, desde el punto de vista morfológico, en contraste con los resultados que aquí presentamos. Esta observación, aunada al hecho de encontrar una reacción positiva para colinesterasa, sugiere, por un lado, que el tejido heterotópico a pesar de encontrarse en crecimiento y presentar una buena integración con el huésped, requiera de más tiempo para empezar a producir algún factor humoral o la circuitería necesaria para ejercer alguna influencia sobre la conducta del sujeto. Como se sabe, la corteza es una de las estructuras cerebrales que termina tardamente su desarrollo, incluso semanas después del nacimiento; es muy

probable entonces, que este tejido tome un lapso de tiempo mayor para iniciar una interacción mas estrecha con el huésped y efectuar así algún cambio en la conducta del sujeto. A este respecto Stenevi et al., (1976), indican que la edad del sujeto del cual se extraerá el tejido que va a ser transplantado es determinante tanto para su integración como para la recuperación funcional del sujeto huésped. Otros autores enfatizan la importancia del tiempo de desarrollo del donador, ya que ciertos eventos en el desarrollo se llevan acabo en periodos criticos, de manera que un tejido puede tomar rutas distintas en su desarrollo dependiendo de la estimulación durante este periodo critico (Jacobson, 1980). Por otro lado, la reacción positiva para AchE dentro del tejido transplantado no necesariamente establece la presencia de acetilcolina como neurotransmisor, puesto que la reacción histoquímica no asegura la presencia del neurotransmisor, y sólo refleja una acción enzimática, que por otra parte, es bien conocido que puede estar involucrada en una serie de eventos neuroquímicos, como el procesamiento de péptidos e inclusive se ha llegado a postular que posee efectos neurotróficos (Moody-Corbett et al., 1981,1982; MacIntosh, 1982; Landis y Keefe, 1983; Varón et al., 1980).

FIGURA I

Gráfica que muestra los resultados pre y post-transplante obtenidos para la actividad motora de las ratas que recibieron transplante de corteza fetal (CX). (* $p < 0.05$, prueba ANOVA) (CON) control.

TRANSPLANTES HETEROTOPICOS CORTEZA

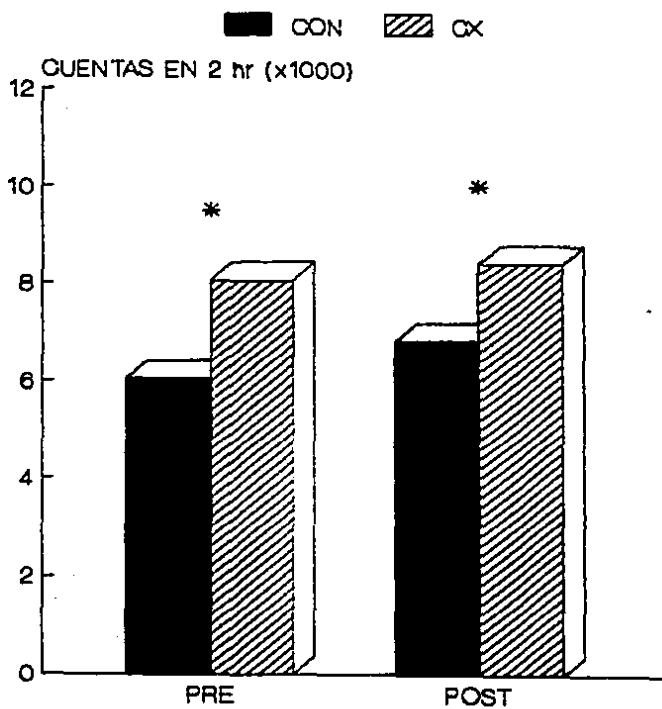
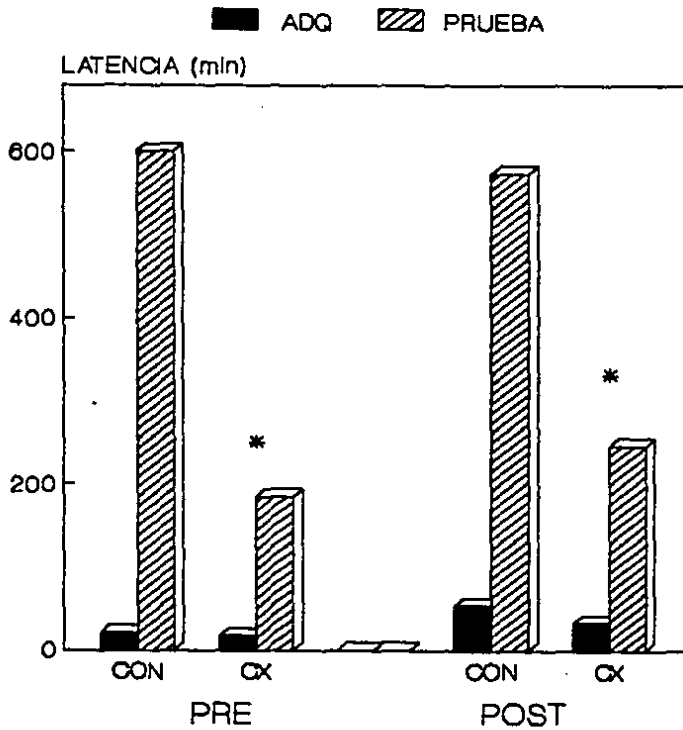


FIGURA II

La gráfica resume los resultados obtenidos para el aprendizaje en el paradigma de prevención pasiva. PRE, datos pre-transplante; POST, datos post-transplante; CON, control; CX, grupo de sujetos que recibieron transplantes de corteza fetal. ($p < 0.05$; ANOVA)

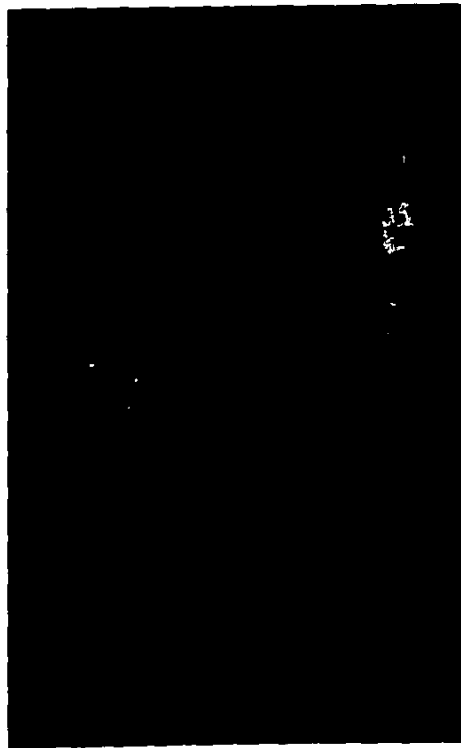
TRANSPLANTES HETEROTOPICOS CORTEZA



*p<0.05

FIGURA III

Fotomicrografías que muestran cortes transversales de cerebro de rata con trasplantes de corteza frontal fetal en el área estriatal. a) Las flechas indican el borde del trasplante. Nótese la reacción intensa en el estriado huésped (h) y el puntilleo en el trasplante (t). (x4). b) Aumento de a. Se muestran una serie de células positivas para la histoquímica de AChE (flechas) (x40). c) Corte transversal seriado con el anterior en un plano a nivel frontal. Obsérvese la reacción para AChE en el centro del trasplante (x40). d) Aumento de c. Las flechas indican las fibras positivas para la histoquímica en el trasplante (x40).



TRABAJO III

TRABAJO III

MARCAJE DE TEJIDO NEURAL: VIRUS SENDAI

La técnica de trasplantes cerebrales ha sido una herramienta muy útil en Neurociencias. Para un gran número de estudios, el poder marcar las neuronas representaría una gran ayuda para resolver problemas como la sobrevivencia, diferenciación y posible migración de las células que van a ser transplantadas. Hasta ahora las técnicas que se han utilizado (colorantes fluorescentes o el marcaje autoradiográfico) (Das y Altman, 1972; Jones y Ficoetner, 1985) tiene algunos inconvenientes, tales como la difusión del marcador, la aparición de un fondo muy alto en las preparaciones, etc. Así pues, Ardizzoni *et al.*, (1988), propusieron un marcaje con oro coloidal inyectado en las células, por medio de la cápside del virus sendai. Este virus, es altamente fusógeno para la mayor parte de las células de vertebrados, y no es patógeno para el ser humano. Las actividades de fusión desarrolladas por este virus, se deben principalmente a dos glicoproteínas localizadas en la envoltura de la cápside. Así pues, utilizando estas propiedades, Ardizzoni realizó el marcaje de células de la región del núcleo basal magnocelular de fetos de 18 días de gestación, y transplantadas en la neocorteza de ratas adultas; los autores reportan que estas células sobrevivieron durante tres meses en la corteza y que además algunas de estas células marcadas migraron subcorticalmente hacia la región lesionada del núcleo basal.

Con base en los estudios antes mencionados, decidimos iniciar el estudio del marcaje de tejido neural para su posterior trasplante al estriado lesionado, con el fin de obtener información sobre el comportamiento de migración de las células transplantadas.

MÉTODOS

Producción de cápsides de virus y oro coloidal: se utilizó el procedimiento de Ardizzoni et al., (1988), modificado por el Dr. Steve Sivy (comunicación personal), y en colaboración con los Dres. Ruy Pérez Montfort y Octavio González. El procedimiento general fue el siguiente:

Cincuenta mililitros de virus (SPAFAS, Inc.) fueron centrifugados a 3000 rpm por 20 minutos. Se descartó el precipitado y se recentrifugó a 37000 g por 30 minutos y a 4°C. Se descartó el sobrenadante, teniendo cuidado de no agitar el precipitado; se resuspendió en seguida el precipitado en 800 µl de la solución 1 (100 mM NaCl; 50 mM de TRIS-base, pH 7.4), con 10 µl de 10 M de PMSF (en agua destilada) y 100 µl de tritón X-100 al 20%, en un volumen total de 1 ml. Esta mezcla se incubó durante una hora a 20°C. Posteriormente se centrifugó a 100,000 g por una hora a 4°C. Después se descartó el precipitado y se añadió un volumen igual de oro coloidal (v/v; Polisciencias Inc.). Se mezcló el sobrenadante y el oro coloidal con una pipeta pasteur hasta su homogenización. Esta mezcla se dializó contra una solución de 900 ml. de agua

destilada esterilizada, con 100 ml de solución 2 (100 mM de TRIS-base; 20 mM de CaCl₂; 20 mM de MgCl₂) y un gramo de Bio-esferas (Bio-Beads; BIO-RAD), por cinco horas a 25°C y tres veces más por un periodo total de 30 a 35 horas. Finalmente se centrifugó el contenido de la diálisis por 5 minutos a 4°C a 100,000 g; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de la solución 1, para finalmente dividirlo en alícuotas de 100 μ l.

Preparación de las células para el transplante: en todos los casos se obtuvieron fetos de 15 días de gestación a partir de las madres anestesiadas con pentobarbital (50 mg/kg), cuyo útero se sumergió en una solución salina (0.15 M). De 7 fetos se tomaron los cerebros y se disecaron los estriados de cada uno de ellos. El tejido fue disgregado por medio de una pipeta pasteur, hasta su homogenización en solución 1. En cada ocasión se realizó el conteo de células totales y sobrevivencia de las mismas por medio del método de exclusión de azul de tripano. Se diseñaron tres experimentos distintos. En cada uno de ellos se variaron los tiempos de incubación, concentración del virus con respecto a la concentración celular, etc; para todos los casos, las células fueron transplantadas en ratas previamente lesionadas (véanse trabajos 1 y 2), las cuales 15 días después fueron sacrificadas y procesadas para su observación (fijación intracardiaca con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.1% en buffer fosfatos

0.1M, pH 7.4, salina 0.15M; tinción para violeta de cresilo).

Experimento 1.

En un volumen final de 1 ml. se mezclaron 10 μ l de la suspensión de células (aproximadamente 1×10^6), 100 μ l de virus marcados con oro, solución 1 y 10 mM de CaCl. Esta mezcla se incubó a 37°C, en agitación moderada, por una hora; después se centrifugó a 750 r.p.m., a 4°C por un minuto y se descartó el sobrenadante. Esta operación se repitió una vez más. Finalmente, las células se resuspendieron en salina estéril 0.15 N, para ser transplantadas en el estriado lesionado de una rata adulta (10 μ l en cada estriado). Como control se siguió el procedimiento anterior, pero excluyendo la adición de los virus marcados.

Experimento 2

Se incubaron un mismo número de células (1×10^6 en 10 μ l) en presencia de diluciones crecientes de virus marcados con oro (1:100, 1:10, 1:5, 1:2 y 1:1 ó alicuota completa y en ausencia de virus marcado). El procedimiento de incubación fue equivalente al del experimento 1; 10 μ l de cada dilución fue administrado en uno de los dos estriados de ratas previamente lesionada. de tal manera que los sujetos quedaron distribuidos de la siguiente manera:

Rata	Estriado Izquierdo	Estriado derecho
1	1:1	1:2
2	1:5	1:10
3	1:100	0

Experimento 3

En este experimento, se variaron los tiempos de incubación en 15 y 30 minutos; los controles en este caso se incubaron una hora con o sin cápsides marcadas con oro. Los trasplantes se elaboraron de manera unilateral en sujetos previamente lesionados en el estriado.

RESULTADOS

En el experimento 1, se observaron gran cantidad de células formando grupos al momento de incubarias con las cápsides marcadas con oro. Al inicio del experimento se contaba con una viabilidad del 50% (de un total de 1×10^6 células/ml), y dos horas después al momento de tranplantar se contaba con una viabilidad de 27% en las células incubadas sin virus, y nula la viabilidad en aquellas incubadas con el virus marcado. El tejido transplantado dejó de manifiesto los resultados anteriores: el sitio donde se transplantaron las células incubadas sin virus, presentó un tejido en mal estado, aunque se lograban observar algunas células dentro de una redicula de tejido conectivo; en cambio, en el sitio donde se depositaron las células incubadas con virus marcados con oro se observaron únicamente células dañadas con oro en su interior, aunque también pudieron reconocerse agregados de oro distribuidos en la zona de inyección de las células. (ver Fig. IV).

Pensando en que la concentración de virus marcados ejercía

una aglutinación excesiva y muerte de las células decidimos probar diferentes diluciones del virus. En la única dilución en que fue posible apreciar algún tejido en buen estado, fue en la mayor de ellas, esto es, en la dilución 1:100. A pesar de que las células carecían de un aspecto saludable, podían observarse íntegras y con partículas de oro en su interior. También se observó la existencia de células marcadas que parecían salir del sitio de inyección del trasplante, e inclusive formaban una vía a través del cuerpo calloso, e incorporarse al estriado que había recibido células incubadas en ausencia de virus.(Fig. IVb).

Finalmente para incrementar la supervivencia de las células incubadas se disminuyó el tiempo de incubación en el virus con los siguientes resultados: al finalizar la incubación las células, sin virus obtuvieron un 25% de viabilidad, en dos horas totales de incubación, y para el mismo tiempo con incubación en virus se obtuvo un 4% de viabilidad; para una hora de incubación, 12%; para 30 minutos totales, 20%. Morfológicamente, el tejido tenía un aspecto de mayor integración conforme se disminuía el tiempo de incubación, aunque nunca pudieron observarse células totalmente sanas (con sus procesos y soma integrados en su totalidad con el resto del tejido). Cada vez se repitió el marcaje del calloso, inclusive se pudieron identificar las células que portaban la marca a través del calloso, y mas que neuronas parecen ser células gliales o macrófagos, de acuerdo con las evidencias morfológicas.

DISCUSION

Los resultados obtenidos por este conjunto de experimentos dejan de manifiesto una falla notable en el uso del virus sendai para marcar las células de origen nervioso: la aglutinación de estas células, al contacto con las cápsides del virus, revelan una acción agresiva en contra de las membranas y en particular, con los componentes glicoproteicos de las mismas. Esto se traduce en última instancia, en el daño generalizado de la célula. Por otro lado, la disminución dramática del número de células vivas durante el procedimiento, afirman las aseveraciones antes expuestas; asimismo, esta disminución en la sobrevivencia, representa un factor negativo para el objetivo inicial, que es el de obtener células marcadas capaces de integrarse adecuadamente al huésped. A este respecto, resultan menos agresivos los métodos utilizados por otros autores, como marcadores fluorescentes o autorradiográficos (Das y Altman, 1971; Jones y Floetner, 1980), y que inclusive resultan mas eficientes.

Por lo tanto deben observarse reservas en cuanto al uso de esta técnica, en cuanto a un marcaje selectivo de las células; es muy probable que el procedimiento original no tome en cuenta que la muerte y degeneración de las células que ya habían sido marcadas, liberan las partículas de oro, con la consecuente incorporación de las mismas en células con gran capacidad de fagocitosis, como son los macrófagos o algunas células gliales,

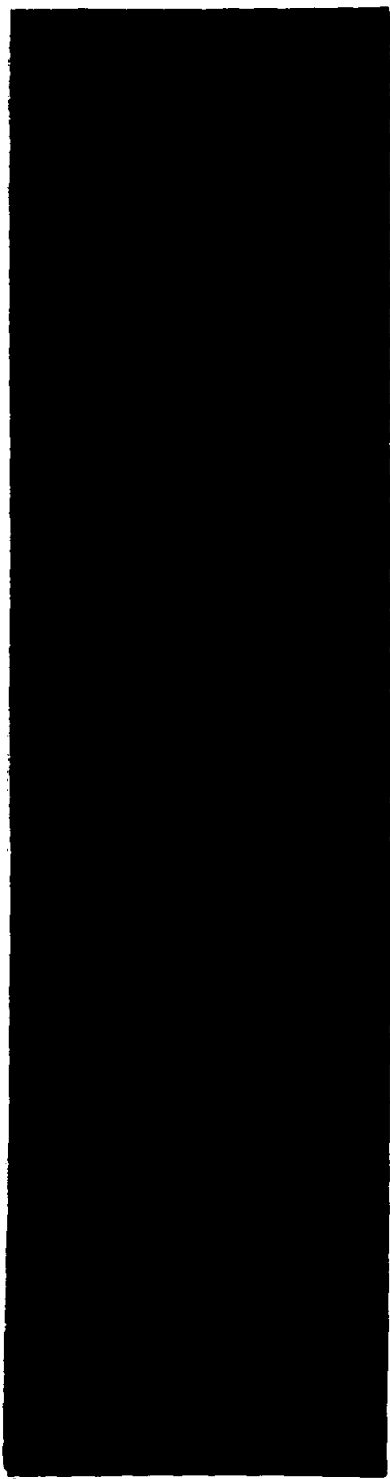
cuyo origen se localiza es el huésped y no las células transplantadas.

Como en toda técnica, se pueden establecer pros y contras, pero el éxito de una técnica radica, sin lugar a dudas, en su sencillez para ser manipulada, en su eficiencia y en la facilidad para interpretar los resultados que de ella se obtengan. Tenemos aquí un ejemplo de una técnica que hasta ahora no ha podido ser replicada por algún otro autor, y cuyos resultados son difíciles de interpretar debido a las incógnitas originadas por el daño morfológico sufrido por las células (inclusive observadas en las fotografías del artículo original).

Muy probablemente, la complementación de esta técnica con otras alternativas, como son el marcaje fluorescente o el marcaje específico de DNA, nos puedan proveer de la información requerida en el estudio de los trasplantes de tejido cerebral fetal.

FIGURA IV

Fotomicrografías que muestran cortes transversales de cerebro de rata que recibieron trasplantes con células incubadas con virus Sendai. a) Trasplante con células incubadas según el protocolo original. (x10). b) Trasplantes de estriado fetal después de 2 horas de incubación con virus Sendai, dilución 1:100 (T+VS), y con buffer tris (T). Las flechas indican los sitios en donde pueden observarse células marcadas con oro. (x4)



DISCUSION GENERAL

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

DISCUSION GENERAL

Los trasplantes de tejido cerebral fetal en el estriado lesionado constituyen un modelo experimental sólido, por medio del cual ha sido posible estudiar tanto la incorporación funcional del tejido neural embrionario en el cerebro adulto, como el funcionamiento de una estructura tan compleja como lo es el neocórtex.

Nuestros datos muestran que las lesiones electrolyticas bilaterales de la porción dorsal de la cabeza del caudado, producen un deterioro en la adquisición del aprendizaje de prevención pasiva. Esto concuerda con los resultados obtenidos por varios autores (Wyers, 1968; Winocur, 1974; Prado-Alcalá, 1973, 1980), en los que diversos tipos de lesiones del estriado producen un impedimento marcado en el aprendizaje de diversas tareas instrumentales, y entre estas, la prevención pasiva. Asimismo, encontramos que este tipo de lesiones producen un aumento de la actividad motora, datos que corroboran lo expuesto por Ungerstedt y Arbuthnott (1970), Sanberg et al. (1979) y Deckel et al. (1983), quienes observaron un aumento en la actividad motora después de haber realizado lesiones con sustancias neurotóxicas.

Por otro lado, los trasplantes de tejido cerebral fetal generaron una recuperación selectiva. Así, los trasplantes de

sustancia nigra fetal, produjeron recuperación en la actividad motora, sin embargo no produjeron recuperación en la habilidad para aprender. Varios autores han reportado que los trasplantes de sustancia nigra fetal reducen las anomalías motoras creadas por lesiones con neurotóxicos tales como el ácido kainico o el iboténico o por 6-OHDA (Perlow et al., 1979; Björklund y Stenevi, 1979; Freed, 1983; Dunnett et al., 1983).

Asimismo, se ha establecido que la dopamina está asociada con la regulación de la actividad motora (Ungerstedt, 1971a). Con base en esta idea, algunos autores iniciaron los estudios sobre trasplantes de médula adrenal (que es conocida por sus altas concentraciones de catecolaminas) en el estriado lesionado o en el ventrículo lateral (adyacente al estriado) (Freed et al., 1981), con resultados positivos en cuanto al restablecimiento de la actividad motora. Incluso este tipo de experimentos sentaron la base para terapias experimentales de algunas enfermedades motoras en humanos, como lo es el Parkinson (Olson, 1984; Madrazo et al., 1985). En nuestro caso, los datos sugieren que la dopamina observada de manera indirecta, por medio de la inmunocitoquímica para tirosina hidroxilasa en células y fibras dentro de los trasplantes de sustancia nigra, puede estar involucrada en la recuperación de dicha función.

Por otra parte, los sujetos que recibieron trasplantes de estriado fetal, recuperaron su capacidad para adquirir el

aprendizaje de prevención pasiva. A este respecto, nuestro trabajo es el único que reporta la acción de este tipo de trasplantes sobre la recuperación del aprendizaje en dicho paradigma. Isacson y colaboradores (1984,1986), aplicaron trasplantes de estriado fetal intaestriatalmente en ratas que, posteriormente recuperaron la habilidad para aprender, utilizando en este caso, el paradigma del laberinto en T. Sin embargo, este tipo de tareas de aprendizaje son un tanto diferentes a la tareas de prevención pasiva en cuanto a la motivación en la adquisición del aprendizaje: en el laberinto se utiliza un reforzador positivo, en tanto que en la prevención pasiva como ya dijimos, se utiliza el stress como estímulo condicionado y por lo tanto el reforzador es negativo o de evitación al estímulo (choque eléctrico) que se presenta durante la adquisición (Wyers et al., 1988). De tal forma, al hacer la comparación entre estos dos ejemplos de recuperación por trasplantes, debemos tomar en consideración que en el estriado se guarda una compartamentalización funcional (Winocur, 1974; Graybiel y Ragsdale, 1983; Prado-Alcalá et al.,1977), por lo que debe elaborarse el análisis del sitio y extensión de la lesión, y de la administración del trasplante.

El mismo Isacson (1986) encuentra recuperación motora por trasplantes de estriado fetal. De tal manera que las diferencias con nuestros resultados pueden ser interpretadas como diferencias metodológicas. En nuestros experimentos las lesiones producidas

son electrolíticas, dichas lesiones comprendían la región dorsal de la cabeza del caudado, en tanto que Isaacson lesiona con ácido iboténico en regiones más centrales (prácticamente entre la región dorsal y ventral de la cabeza del estriado).

Asimismo, las funciones de aprendizaje y de memoria en el estriado han sido relacionadas con el buen funcionamiento de sus vías colinérgicas (Prado-Alcalá, et al., 1977; 1980; Bermúdez-Rattoni et al., 1986). Como ya se mencionó en la sección de resultados, los trasplantes estriatales mostraron una reacción positiva a la histoquímica para colinesterasa, en fibras y células en tanto que los de sustancia nigra no mostraron reacción para la histoquímica. Aunque es preciso elaborar cuantificaciones de acetilcolina o bloques colinérgicos farmacológicos, estos datos sugieren que este tipo de trasplantes (estriatales), pueden poseer acetilcolina y que de alguna manera la presencia de ésta está involucrada en la recuperación del aprendizaje de tareas instrumentales.

Los resultados obtenidos para los trasplantes de corteza frontal fetal, esto es, la persistencia en las deficiencias motora y de aprendizaje, aún después de desarrollado el trasplante, sugiere que debe existir especificidad del tejido en los procesos de integración. A este respecto, Escobar y colaboradores (1980) efectuaron trasplantes homotópicos y heterotópicos en la corteza gustativa, y encontraron que sólo los trasplantes homotópicos

fueron capaces de integrarse adecuadamente al huésped, además de promover la recuperación funcional. De hecho, estos autores reportaron que los trasplantes heterotópicos en la corteza gustativa mostraron un deterioro morfológico marcado. En contraste, los trasplantes de corteza frontal mostraron una integración adecuada e inclusive algunas de sus células resultaron ser positivas para la histoquímica para colinesterasa; sin embargo debe tomarse en cuenta el grado de madurez de la corteza con respecto al estriado de la misma edad (15 días de gestación). El grado de madurez es prácticamente sinónimo de especialización (Seiger, 1985). Así, en el caso de la corteza, aún podrían variar sus rutas metabólicas y su funcionalidad con mayor facilidad (teórica) que el tejido estriado o el nigral. De tal manera, podríamos pensar que las interacciones tróficas entre el huésped y el trasplante podrían desviar la diferenciación de la corteza hacia otro tipo de estructura o de producción de sustancias neuroquímicas. Este tipo de influencias se han logrado observar en neuronas en cultivo; así, se ha demostrado que las neuronas que en estado adulto son predominantemente catecolaminérgicas, durante su desarrollo temprano pueden ser influenciadas por el factor de crecimiento neuronal y transformarse en colinérgicas. (Moody-Corbett et al., 1981, 1982; MacIntosh, 1982; Landis y Keefe, 1983; Varón et al., 1980)

Otro aspecto relevante, es el relacionado con el sitio de

depósito del trasplante; al respecto Dunnett y colaboradores (1988), han encontrado que la recuperación funcional depende del lugar donde se ha colocado el trasplante, así, reportan que los trasplantes de sustancia nigra que son colocados en los ventrículos laterales sólo promueven la recuperación motora de ratas con lesiones estriatales en un 40%, en tanto que este mismo tejido, colocado dentro del parénquima estriatal, produce una recuperación prácticamente total. El análisis y comparación de nuestros datos, con estos hallazgos, correlaciona en cuanto a que los trasplantes de sustancia nigra se desarrollaron dentro del estriado huésped, sin embargo, los trasplantes de estriado fetal se desarrollaron prácticamente en el ventrículo (aunque en conexión con el tejido huésped), pero promoviendo la recuperación del aprendizaje. Asimismo, los trasplantes de corteza se ubicaron siempre en contacto con el huésped y no promovieron la recuperación funcional de las ratas. Esto sugiere que existen diferencias entre cada uno de los tejidos, y su respuesta a los factores de su medio ambiente, por lo que podemos inferir, que para cada modelo, es preciso el estudio minucioso, antes de realizar generalizaciones.

En conclusión, este trabajo ha demostrado:

I. Los trasplantes de sustancia nigra fetal, promueven la recuperación de las anomalías motoras de ratas con lesiones electrolíticas en el estriado dorsal. Esto se relaciona con la

aparición de células y fibras inmunoreactivas para tirosina hidroxilasa.

II. Los trasplantes de estriado fetal promueven la recuperación de ratas con lesiones estriadales en cuanto a sus deficiencias en el aprendizaje. Estos trasplantes contienen una fuerte reacción histoquímica para colinesterasa.

III. Los dos apartados anteriores sugieren una correlación entre la recuperación funcional y el neurotransmisor predominante en cada tipo de trasplante (dopamina y acetilcolina, respectivamente).

IV. Los trasplantes de corteza no promovieron la recuperación funcional de los sujetos, lo que indica la necesidad de un tejido específico para que se establezca la recuperación funcional. Sin embargo, la presencia de reacción positiva para la histoquímica de colinesterasa, sugiere que esta enzima bien podría estar involucrada en procesos diferentes a los de su acción enzimática, como por ejemplo, acciones tróficas. Por último, estos resultados enfatizan que la acción promotora de la recuperación funcional por parte de los trasplantes necesariamente es multifactorial.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Anden N.E., Carlsson A., Dahlstrom A., Fuxe K., Hillarp N. A., Larsson K. (1984). Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci.* 3: 523-530.
- Anden N. E. Rubenson A., Fuxe K., Hokfelt T. (1987) Evidence for dopamine receptor stimulation by apomorphine. *J. Pharm. Pharmac.* 19: 627-629.
- Ardizonni S. C., Michaels A., Arendash G.W. (1988). Labeling of Neural Cells by gold-filled sendai virus envelopes before intracerebral transplantation. *Science* 239:635-637.
- Bermúdez-Rattoni F., Mújica-González N., Prado-Alcalá R.A. (1986). Is cholinergic activity of the striatum involved in the acquisition of positively-motivated behaviors? *Pharmac. Biochem. and Behav.* 24: 715-719.
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger, K. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlation. *J. Neurol. Sci.* 20: 415-455.
- Björklund A., Lindvall O., Isacson O., Brundin P., Victorin K., Strecker R. E., Clarke D. J., Dunnett, S. B. (1987). Mechanisms of action of intracerebral neural implants: studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum. *Trends in Neurosci.* 10: 509-516.
- Björklund A., Stenevi U. (1979). Reconstruction of the dopaminergic nigrostriatal pathway by nigral transplants. *Brain Res.* 177:555-560.
- Björklund A., Stenevi U. (1984). Intracerebral neural implants: neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries *Ann. Rev. Neurosci.* 7: 279-308.
- Björklund A., Stenevi U. (1985). Neural grafting in the mammalian CNS. *Elsevier, Amsterdam.*
- Brundin P., Nilsson O. G., Gage F. H., Björklund A. (1985). Cyclosporin A increases survival of cross-species intra-striatal grafts of embryonic dopamine-containing neurons. *Exp. Brain Res.* 60: 204-208.

Butcher S. G., Butcher L. L. (1974). Origin and modulation of acetylcholine activity in the neostriatum. *Brain Res.* 71: 167-171.

Bruyn G. W., Bots G., Dom R. (1970). Huntington's chorea: Current neuropathological status. En: *Advances in Neurology*. Vol. 23. *Huntington's disease*. Eds. T. Chase, N. Wexler, A. Barbeau. Raven Press, New York. pp. 83-94.

Clarke D. J., Dunnett S. B., Isacson O., Sirinathsinghji D. J. S., Björklund A. (1988). Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions. I Ultrastructural evidence of afferent synaptic inputs from the host nigrostriatal pathway. *Neuroscience* 24: 791-801.

Côté L., Crutcher N. D. (1985). Motor functions of the basal ganglia and diseases of transmitter metabolism. En: *Principles of Neural Sciences*. Eds. E.R. Kandel, J. H. Schwartz. Segunda edición. Elsevier New York. pp. 523-535.

Cotman C. W., Kesslak P. (1988). The role of trophic factors in behavioral recovery and integration of transplants. En: *Progress in Brain Research*. Vol. 78. Eds. D.M. Gash, J.R. Sladek. Elsevier, Amsterdam. pp. 311-319.

Cotman C. W., Nieto-Sampedro M. (1984). Cell biology of synaptic plasticity. *Science* 225: 1287-1294.

Cotman E. W., Nieto-Sampedro M., Harris E. W. (1981). Synapse replacement in the nervous system of adult vertebrates. *Physiol. Rev.* 61: 684-784.

Coyle J. T., Price D. L., DeLong M. R. (1983). Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219: 1184-1190.

Coyle J. T., Schwartz R. (1978). Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 263: 244-246.

Das G. D., Altman J. (1971). Transplanted precursors of nerve cells: their fate in the cerebellum of young rats. *Science* 173: 637-638.

Deckel A. W., Moran T. H., Coyle J. T., Sanberg P. R. y Robinson R. G. (1980a). Anatomical predictors of behavioral recovery following striatal transplants. *Brain Res.* 305: 249-258.

Deckel A. W., Moran T. A., Robinson R. G. (1986b). Behavioral recovery following kainic acid lesions and fetal implants of striatum occurs independent of dopaminergic mechanisms. *Brain Res.* 363: 383-385.

Deckel A. W., Robinson R. G., Coyle J. T., Sanberg P. R. (1983). Reversal of long-term locomotor abnormalities in the kainic acid model of Huntington's disease by day 18 fetal striatal implants. *Eur. J. Pharmacol.*, 93: 287-288.

Divac I., Markowitch H. J., Pritzel M. (1978). Behavioral and anatomical consequences of small intrastriatal injections of kainic acid in the rat. *Brain Res.* 151: 523-532.

Divac I., Rosvold H. E., Schwarzbart M. K. (1967). Behavioral effects of selective ablation of the caudate nucleus. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 63: 184-190.

Dunnett S. B., Björklund A. (1987). Mechanisms of function of neural grafts in the adult mammalian brain. *J. Exp. Biol.* 132: 265-289.

Dunnett S. B., Björklund A., Schmidt R. H., Stenevi U., Iversen S. D. (1983). Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. V Behavioral recovery in rats with bilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspension. *Acta Physiol. Scand. (suppl.)* 522: 39-47.

Dunnett S. B., Isacson O., Sirinathsinghji D. J. S., Clarke D. J., Björklund A. (1988). Striatal grafts in the ibotenic acid-lesioned neostriatum: functional studies. *Progress in Brain Research*. Vol 78. Eds. D.M. Gash, J.R. Sladek. Elsevier, Amsterdam. pp. 39-45.

Dunnett S. B., Iversen S. D. (1981). Learning impairments following selective kainic acid-induced lesions within the neostriatum of rats. *Behav. Brain Res.* 2: 189-209.

Ernst A. M. (1957). Mode of action of apomorphine and dexamphetamine on gnawing compulsion in rats. *Psychopharmacology* 10: 315-323.

Escobar M., Fernández J., Guevara-Aguilar R., Bermúdez-Rattoni F. (1980). Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion. *Brain Res.* 478: 368-374.

Fernández S. M., Solodkin H. M., Prado-Alcalá R. A. (1977). Blockade and activation of caudate cholinergic activity effects in passive avoidance. *Neurosci. Abstr.* 3: 232-236.

Fernández-Ruiz J., Escobar M. L., Piña A. L., Díaz-Cintra S., Cintra-McGleone F. L., Bermúdez-Rattoni F. (1989). Time dependent recovery of taste aversion learning by fetal brain transplants in gustatory neocortex lesioned rats. (enviado a publicación).

Freed W. J. (1983). Functional brain tissue transplantation: reversal of lesion-induced rotation by intraventricular substantia nigra and adrenal medulla grafts, with a note on intracranial retinal grafts. *Biol. Psychiat.* 18: 1205-1207.

Freed W. J. (1986a). Repairing neuronal circuits with brain grafts: where can brain grafts be used as a therapy? 153-156.

Freed W. J., Dymnicki J., Poltorak M., Rodgers C. R. (1988). Intraventricular brain allografts and xenografts: studies of survival and rejection with and without systemic sensitization. *En: Progress in Brain Research Vol. 78, Eds. D.M. Gash, J.R. Sladek. Elsevier, Amsterdam. pp. 233-241.*

Freed W. J., Medinaceli L., Wyatt R. J. (1983). Promoting functional plasticity in the damaged nervous system. *Science* 227: 1544-1552.

Freed W. J., Morihisa J. M., Spoor E., Hoffer B. J., Olson L., Seiger A., Wyatt R. J. (1981). Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behavior. *Nature (Lond.)* 292: 351-352.

Freed W. J., Perlow M. J., Karoun F., Seiger A., Olson L., Hoffer B. J., Wyatt R. J. (1980). Restoration of dopaminergic functions by grafting of fetal rat substantia nigra to the caudate nucleus: long-term behavioral, biochemical and histochemical studies. *Ann. Neurol.* 8: 510-519.

Fuxe K. (1985). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* 247: pp. 39-85.

Fuxe K., Hokfelt T., Olson L., Ungerstedt U. (1977). Central monoaminergic pathways with emphasis on their relation to the so-called "extrapyramidal motor system". *Pharmac. Ther. B.* 3: pp. 180.

Fuxe K., Ungerstedt U. (1970). Histochemical biochemical and functional studies on central monoamine neurons after acute and chronic amphetamine administration. En: *Amphetamine and related compounds*. Ed. E. Costa. Raven Press, New York, pp. 257-288.

Gash D. M., Collier T. J., Sladek J. R. (1985). Neural transplantation: a review of recent development and potential application to the aged brain. *Neurobiol. Aging* 6: 131-150.

Gibbs R. B., Anderson K., Cotman C. W. (1986). Factors affecting innervation in the CNS: comparison of three cholinergic cell types transplanted to the hippocampus of adult rats. *Brain Res.* 383: 362-366.

Gibson M. J., Krieger D. T. (1985). Neuroendocrine brain grafts in mutant mice. *Trends in Neurosc.* : 331-334.

Glick S.D., Greenstein S. (1973). Comparative learning and memory deficits following hippocampal and caudate lesions in mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 82: 188-194.

Graybiel A. M., Ragsdale C. W. Jr. (1983). Biochemical anatomy of the striatum. En: *Chemical Neuroanatomy*. Ed. P.C. Emson. Raven Press, New York. pp. 427-504.

Haycock J. W., Deadwyler S. A., Sideroff S. I., McGaugh J. L. (1973). Retrograde amnesia and cholinergic systems in the caudate-putamen complex and dorsal hippocampus of the rat. *Exp. Neurol.* 41: 201-213.

Heindel W. C., Butters N., Salmon D. P. (1988). Impaired learning of a motor skill in patients with Huntington's disease. *Behavioral Neurosci.* 102(1): 141-147.

Herrera-Marschitz N. (1986). Neuropharmacology and functional anatomy of the basal ganglia. *Acta Phys. Scand. suppl.* 130:1-30

Isacson O., Brundin P., Kelly P. A. T., Gage F. H., Björklund A. (1984). Functional neuronal replacement by grafted neurons in the ibotenic acid-lesioned striatum. *Nature* 311: 458-460.

Isacson O., Dunnett S. B., Björklund A. (1986). Grafted-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2728-2732.

Jacobson M. (1979). Developmental neurobiology. Segunda Ed. Plenum press, New York

Jaeger C. B., Lund R. D. (1980). Transplantation of embryonic occipital cortex to the tectal region of newborn rats: a light microscopic study of organization and connectivity of transplants. *J. Comp. Neurol.* 194: 571-597.

Johnston GAR, Curtis D. R., De Groat W. C., Duggan A. W. (1968). Central actions of ibotenic acid and muscimol. *Biochemical Pharm.* 17: 2488-2489.

Jones E.G., Floetner M.K (1985). Transplants of neocortical from cortex of rats brain-damage in utero. En: *Neural grafting in the mammalian CNS*. Eds. A. Bjöklund, U. Stenouf. Elsevier, Amsterdam. pp. 217-233.

Kirkby R. J., Kimble D.P. (1988). Avoidance and escape behavior following striatal lesions in teh rat. *Exp. Neurol.* 20: 215-227.

Landis S.C., Keefe D. (1983). Evidence for neurotransmitter plasticity in vivo: development changes in properties of cholinergic sympathetic neurons. *Develop. Biol.* 98: 349-372.

Ljungberg T., Ungerstedt U. (1978). Reinstatement of eating by dopamine agonists in a phagic dopamine denervated rats. *Phys. & Behav.* 16: 277-283.

MacIntosh F.C. (1982). Cholinergic transmission: variations on a theme. En: *Progress in cholinergic biology: model cholinergic synapses*. Eds. J. Hanin, A.M. Goldberg. Raven press New York. pp. 1-41.

Madrado I., Drucker-Colin R., Diaz V., Martinez-Mata J., Torres C., Becerril J.J. (1987). Open microsurgical autografts of adrenal medulla to the righ caudate nucelus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 316: 831-834.

Malmfors T., Sachs C. (1968). Degeneration of adrenergic nerves produced by 8-hydroxydopamine. *Eur. J. Pharmacol.* 3: 89-92.

Nanthorpe M., Nieto-Sampedro M., Skaper S.D., Lewis E.R., Bardin G., Longo F.N., Coleman C.W., Varon S. (1983). Neurotrophic activity in brain wounds of the developing rat. Correlation with implant survival in the wound cavity. *Brain Res.* 267: 47-56.

Marsden C.D. (1982). The mysterious motor function of basal ganglia. *The Robert Wartenberg lecture. Neurology* 32: 514-530.

Mason D.M., Charlton H.N., Jones A.J., Lavy C.B.D., Puklavac M., Simmonds S.J. (1986). The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. *Neuroscience* 19: 685-694.

McGeer E.G., McGeer P.L. (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intra-striatal injection of glutamic and kainic acids. *Nature* 263: 517-519.

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

Moody-Corbett F., Cohen N.W. (1981). Location of cholinesterase at sites of high acetylcholine receptor density on embryonic amphibian muscle cell cultured without nerve. *J. Neurosci.* 1: 596-605.

Moody-Corbett F., P.R. Weldon, Cohen N.W. (1982). Cholinesterase location at sites of nerve contact on embryonic amphibian muscle cells in culture. *J. Neurocytol.* 11: 381-394.

Nauta W.J.H., Domesick V.B. (1984). Afferent and efferent relationships of the basal ganglia. *En: Functions of Basal ganglia. CIBA Foundation Symposium.* 107. Pitman, London. pp.3-41

Needels D.L., Nieto-Sampedro M., Whittemore S.R., Cotman C.W. (1983). Neurotrophic activity for ciliary ganglion neurons. Induction following injury to the brain of neonatal adult and aged rats. *Devel. Brain Res.* 18: 275-284.

Nieto-Sampedro M., Cotman C.W. (1986). Growth factor induction and temporal order in CNS repair. *En: Synaptic plasticity and remodeling.* Ed. C.W. Cotman. Gilford Press, New York. pp. 407-458.

Nieto-Sampedro M., Whittemore S.R., Needels D.I., Larson J., Cotman C.W. (1984). The survival of brain transplants is enhanced by extracts from injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 6250-6254.

Oberg R.G.E., Divac I. (1979). Cognitive functions of the neostriatum. *En: The neostriatum.* Eds. I. Divac, R.G.W. Oberg Pergamon, Oxford. pp. 291-314.

Olson L. (1984). On the use of transplants to counteract the symptoms of Parkinson's disease: Background, experimental models and possible clinical applications. *En: Synaptic plasticity and remodeling.* Ed. C. Cotman. Gilford Press, New York. pp. 570-610

Paxinos G., Watson Ch. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press, Sydney.*

Perlow M.J., Freed W.J., Hoffer B.J., Seiger A., Olson L., Wyatt R.J. (1970). Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction on nigrostriatal dopamine system. *Science* 204: 643-647.

Prado-Alcalá R.A. (1985). Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory? *Life Sciences* 37: 2135-2142.

Prado-Alcalá R.A., Cobos-Zaplain G.G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Res.* 138: 190-196.

Prado-Alcalá R.A., Fernández-Sambiancat M., Solodkin M. (1985). Injections of atropine into the caudate nucleus impair the acquisition and maintenance of passive avoidance. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22: 243-247.

Prado-Alcalá R.A., Grinberg-Zylberbaum J., Alvarez-Leeffmans J., Brust-Carmona H. (1973). Suppression of motor conditioning by the injection of 3M KCl in the caudate nuclei of cats. *Phys. and Behav.* 12: 249-253.

Prado-Alcalá R.A., Kaufmann P., Nowson R. (1980). Scopolamine and KCl injections into the caudate-putamen. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12: 249-253.

Prado-Alcalá R.A., Signoret-Edward L., Figueroa N., Giordano M., Barrientos M.A. (1984). Post trial injection of atropine into the caudate nucleus interfere with long-term but not with short-term retention of passive avoidance. *Behav. Neurol. Biol.* 42:81-84.

Pritzel M., Isacson O., Brundin P., Wiklund L., Björklund A. (1980). Afferent and efferent connections of striatal grafts implanted into the ibotenic acid lesions neostriatum. *Exp. Brain Res.* 65:112-126.

Reisman G. (1960). Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res* 14: 25-49.

Rosvold H.E. (1968). The prefrontal cortex and caudate nucleus: a system for affecting correction in response mechanisms. In: *Mind as a tissue*. Ed. C. Rupp. Hoeber, New York. pp. 21-38.

Sanberg P.R., Hanault M.A. (1986). Fetal striatal transplants restricted to lateral ventricles in striatal lesioned rats do not produce recovery of abnormal locomotion. *Soc. Neurosci. Abstr.* 12: 563-568.

Sanberg P.R., Pisa M., Fibiger H.C. (1979). Avoidance operant and locomotor behavior in rats with neostriatal injections of kainic acid. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10: 137-144.

Scatton B., Javoy-Argid F., Rouquier L., Dubois B., Argid Y. (1983). Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res.* 275: 321-328.

Schmidt R.H., Björklund A., Stenevi U. (1981). Intracerebral grafting of dissociated CNS tissue suspensions: a new approach for neuronal transplantation to deep brain sites. *Brain Res.* 218: 347-360.

Schwarcz r., Hokfelt T., Fuxe K., Jonsson G., Goldstein M., Terenius L. (1979). Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: A morphological and neurochemical study. *Exp. Brain Res.* 37: 199-210

Seab J.J. (1983). Anatomy and pathology of extrapyramidal diseases. *Brain Res. Bull.* 11: 135-141.

Seiger A. (1986). Preparation of immature central nervous system regions for transplantation. *En: Neural grafting in the mammalian CNS.* Eds. A. Björklund, U. Stenevi. Elsevier, Amsterdam. pp.71-77.

Shiral Y. (1921). Transplantation of rat sarcoma in adult heterogeneous animals. *Jap. Med. World* 1: 14-15.

Stenevi U., Björklund A., Svendgaard N. (1976). Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival. *Brain Res.* 114: 1-20.

Teuber H.L. (1974). *Neurosci. Res. Program. Bull.* 12: 197-199.

Ungerstedt U. (1968). 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharm.* 5: 107-110.

Ungerstedt U. (1971a). Stereotaxic mapping of the monoamine pathway in the rat brain. *Acta Physiol. Scand. suppl.* 367: 1-48.

Ungerstedt U. (1971b). Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand. suppl.* 367: 89-93.

Ungerstedt U. (1971c). Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* 367:95-122.

Ungerstedt U., Arbuthnott G.W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24: 485-493.

Ungerstedt U., Herrera-Marschitz M. (1981). Behavioral pharmacology of dopamine receptor mechanisms. En: *Chemical Neurotransmission: 75 years.* Eds. L. Stajarne, P. Hedqvists, H. Lager Krantz, A. Wennmalm. Academic Press, New York. pp. 481-494.

Varon S., Haag T., Vahlsing H.L., Manthorpe M. (1988). Nerve growth factor actions on cholinergic neurons in the adult rat CNS. En: *Cell function and disease.* Eds. L.E. Coffedo, L.E. Todd, L. Packer, J. Jas. Plenum publishing corp., New York. pp. 235-248.

Victorin K., Simerly R.B., Isacson O., Swanson L.W., Björklund A. (1980). Connectivity of striatal grafts implanted into the ibotenic acid lesioned striatum. III. Efferent projecting grafts neurons and their relation to host afferents within the grafts. *Neuroscience* 30 (2): 313-330

Wieland T. (1968). Poisonous principles of mushrooms of the genus *amanita*. *Science* 159: 948-952.

Wilson S.A.K. (1914). An experimental research into anatomy and physiology of the corpus striatum. *Brain* 36: 427-492.

Winocur G. (1974). Functional dissociation within the caudate nucleus of rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96:432-439.

Wyers E.J., Peeke H.V.S., Ellison J.S., Herz N.J. (1968). Retroactive impairment of passive avoidance learning by stimulation of the caudate nucleus. *Exp. Neurol.* 22: 350-366.