

9
2ej 11232



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIURGIA

IMPLANTE HETEROTOPICO DE TEJIDO
CEREBELOSO FETAL A RECEPTOR ADULTO
DE RATA WISTAR
DESARROLLO DE TECNICA DE TRASPLANTE

Carina Lauer

TRABAJO DE TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO
UNIVERSITARIO DE:
NEUROCIURJANO
P R E S E N T A :

DR. RODOLFO ONDARZA ROVIRA



**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.

INDICE

	Página
1. Introducción	1
2. Definiciones	4
3. Antecedentes	8
4. Objetivos	29
5. Material y Método	31
6. Resultados	63
7. Discusión	71
8. Conclusiones	85
9. Bibliografía	89

INTRODUCCION

"Los que sueñan de día tienen conocimiento de muchas cosas que escapan a los que sueñan únicamente de noche."

E. Allan Poe

1. INTRODUCCION

A partir del siglo pasado se ha dado inicio a los primeros intentos de trasplantar tejido neural al Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos.

Mejorándose paulatinamente los resultados en cuanto a supervivencia del implante y convirtiendo a estas técnicas en un medio viable para el estudio de la neurogénesis, diferenciación neuronal, organización citoarquitectónica, sinaptogénesis y regeneración de conexiones en el SNC de mamíferos. Llegando a obtenerse también mejores conocimientos sobre las diversas variables que afectan al trasplante y al receptor, así como sobre las interacciones que ocurren entre el tejido implantado y el receptor.

Entre los múltiples éxitos que se han logrado con estas técnicas, podemos mencionar, la restitución o incorporación de funciones neuroendócrinas y de neurotransmisión, y con ello, cambios de conducta como la sexual y facilitación del aprendizaje; restitución de vías visuales, incorporación de funciones motoras; y otras como la supresión o inducción de actividad epiléptica, etc.

Por otra parte estos estudios han conducido a su utilización en el ser humano, tal es el caso del empleo de médula adrenal y sustancia nigra en pacientes con enfermedad de Parkinson.

En cuanto a la implantación de tejido cerebeloso, son escasos los reportes realizados, y prácticamente todos han sido efectuados en regiones neocorticales, a diferencia del presente trabajo.

No existen reportes previos sobre este tipo de trasplante en Iberoamérica, ni tampoco se ha propuesto en la literatura su empleo en modelos de epilepsia experimental.

Sobre la génesis de la actividad epiléptica existen múltiples teorías, en lo que coinciden los diferentes autores es en la importancia que tienen distintos neurotransmisores en esta patología. De tal manera que uno de estos neurotransmisores, el ácido gama-aminobutírico (GABA) y sustancias afines se han empleado como inhibidores de la actividad epiléptica.

Se sabe que varias células de la corteza cerebelosa (células de Purkinje, estrelladas, en cesto y de Golgi) son productoras de este neurotransmisor, de manera que es de esperarse que estas células, implantadas en un sitio con bajo umbral epiléptico, como es el núcleo amigdalino, o en un sitio en donde pueda existir una amplia difusión del neurotransmisor, como el sistema ventricular, puedan modificar la actividad epiléptica mediante la liberación de GABA.

Múltiples técnicas de trasplante se han desarrollado por los diferentes equipos de investigadores, sin embargo no se cuenta con una técnica que se adecuara a nuestros propósitos; tales como la implantación profunda de tejido heterotópico, con posibilidades de monitorización electrofisiológica y/o la instalación de un sistema de tipo "push-pull" directamente en el sitio implantado así como en otras regiones cerebrales en forma simultánea; practicando una sola cirugía al receptor.

De manera que siendo el desarrollo del método de implantación el punto capital para lograr los objetivos, es la descripción de de la elaboración de esta técnica el aspecto principal de este trabajo; esperando que esta experiencia sea útil y aporte una base a investigaciones ulteriores.

(6,7,8,9,10,15,16,20,21,22,23,24,25,26,27,29,33,37,39,42,
46,52,53,55,56,59,68,71,72,79,80,81,83,86,92,97)

DEFINICIONES

"El hombre es lo que quiere ser."

J.P. Sartre

2. DEFINICIONES Y CLASIFICACIONES

La palabra trasplante se emplea en el sentido más amplio para denotar toda extirpación o desprendimiento parcial de una parte de la economía y su implantación en la economía del mismo sujeto o de otro.

Según emplearemos las palabras, injerto o implante son sinónimos de trasplante; huésped y receptor son sinónimos.

Las siguientes clasificaciones son aplicables al trasplante terapéutico en el ser humano y al experimental en general en el animal.

Según las relaciones genéticas entre donador y receptor, hay cuatro clases de trasplantes; a saber:

1) autoinjerto-donador y receptor son el mismo sujeto; 2) iso-injerto o injerto singénico-donador y receptor son individuos genéticamente idénticos de la misma especie (injerto entre gemelos homocigóticos o entre animales de una cepa muy endogámica); 3) aloinjerto u homoinjerto-donador y receptor son individuos genéticamente diferentes de la misma especie, y 4) xenoinjerto o heteroinjerto-donador y receptor son individuos de distintas especies.

Según el sitio de implantación, los trasplantes son ortotópicos si están rodeados por la misma clase de tejidos o situados en la misma parte de la economía después del trasplante que antes;

de lo contrario, son heterotópicos.

Según la técnica de implantación, los trasplantes se clasifican de la siguiente manera:

Injertos anastomosados-la circulación del huésped se establece en el injerto al efectuar el trasplante por anastomosis vascular; injertos pediculados-el injerto se conecta al sitio donador por lo menos pasajeramente valiéndose de un pedículo que posee vasos sanguíneos; injertos libres-fragmentos aislados de tejido que carecen de conexiones vasculares, nerviosas o linfáticas al terminar el procedimiento de trasplante, e injertos transfundidos-el injerto se establece valiéndose de la inyección constante de una suspensión celular en corriente circulatoria, cavidad corporal o tejidos del huésped.

Los injertos pueden ser viables o no cuando se colocan.

Los trasplantes también pueden clasificarse de otras maneras; a saber:

Con relación a la anatomía, la histología y la citología del injerto; según si el injerto es de un donador embrionario o maduro; si el receptor es inmunológicamente inmaduro (fetal temprano) o maduro (postnatal y adulto); si el sitio de implantación es o no privilegiado, esto es un sitio que protege al injerto del rechazo (v.gr.: cámara anterior del ojo, dentro del cerebro o el testículo); según si el injerto es de tejido neoplásico o no, según la técnica y la duración de preservación y almacenamiento del injerto; si la finalidad es terapéutica o expe-

rimental, y así sucesivamente.

De acuerdo con las definiciones y clasificaciones anteriores, podemos decir que este estudio se refiere a un trasplante experimental, de tipo heterotópico y singénico, microinyectado, viable, de tejido cerebeloso fetal a núcleo amigdalino, sistema ventri- y núcleo caudado maduros, empleando ratas Wistar. (78,82)

ANTECEDENTES

"Es un error capital teorizar. Antes
de que se tengan los datos."

A.C. Doylo

3. ANTECEDENTES

Para poder implementar una técnica útil para nuestros fines, es necesario tener conocimiento sobre la evolución que han tenido los trabajos previos en esta área. Por lo que haremos una revisión de dichos estudios, primero sobre trasplantes neurales en general, enfocándonos posteriormente en las investigaciones que se han realizado con tejido cerebelos, y en las aplicaciones que se han dado a los implantes neurales en modelos de epilepsia experimental.

Siendo la edad gestacional del donador probablemente el factor más importante para lograr el éxito de la implantación, es indispensable la revisión de la literatura referente al desarrollo del cerebelo en las etapas prenatal y postnatal.

Finalmente hacemos un compendio sobre la parte de la neuroquímica que nos interesa de las células de la corteza cerebelosa, mencionándose patologías humanas en que se encuentra implicada la disfunción de sistemas gabaérgicos.

IMPLANTES NEURALES INTRACEREBRALES

ANTECEDENTES HISTORICOS

Thompson (1890) y Saitykow (1905) fueron probablemente los primeros en reportar resultados de trasplante de tejido adulto del SNC, y Del Conte (1907) el primero en realizar trasplantes de tejido embrionario a cerebros de mamíferos.

Los primeros resultados fueron desalentadores; Del Conte, en particular, concluyó que el cerebro era un sitio desfavorable para trasplante. Resultados negativos similares fueron subsecuentemente publicados por Altobelli (1914), Willis (1935), Glees (1955), Wenzel y Bärlechner (1969) y por Frotscher (1970).

Ranson (1914) y Tidd (1932) obtuvieron supervivencia parcial de ganglios sensoriales trasplantados a la corteza cerebral de ratas en desarrollo, y Dunn (1917) reportó supervivencia de 4 de 44 implantes de corteza cerebral neonatal en la corteza de ratas de 9 a 10 días de edad.

El estudio más interesante en los principios de la literatura es el de Le Gros Clark (1940). El describió supervivencia excelente y la diferenciación en un caso de implante de neocorteza embrionaria a la corteza de un conejo de 6 semanas de edad.

En vertebrados inferiores estas técnicas se han usado para -

estudiar mecanismos de regeneración neuronal, especialmente del sistema retino-tectal.

Matthey (1926), Stone (1944), Stone y Zeur (1940) y Sperry (1945) mostraron que ojos trasplantados o reimplantados en salamandras o ranas pueden regenerar una nueva vía retino-tectal con restauración de la visión.

Más recientemente, la técnica de trasplante neural ha sido aplicada exitosamente en el tectum óptico de peces o ranas Sharma y Gaze (1971), Yoon (1973, 1975, 1977, 1979), Levin y Jacobson (1974). Estos trasplantes se reinervan por los axones retino-tectales del huésped.

Otro ejemplo de trasplante exitoso en vertebrados inferiores, es aquél de segmentos de médula espinal en anfibios en desarrollo Detwiler (1936), Pratt (1940), Weiss (1950), Székely (1963, 1968), Straznicky (1963).

Estos implantes establecen conexiones neuromusculares apropiadas y pueden proveer movimientos coordinados normales de la extremidad.

De particular interés son las observaciones de Székely (1963, 1968) en relación a que segmentos de médula espinal en desarrollo, trasplantados junto con una extremidad en desarrollo, no solo reinervó los músculos de la extremidad trasplantada, sino que además los animales podían mover dicha extremidad con movimientos similares a los de la marcha.

Por otra parte Stenevi (1976) y Björklund (1976) fueron los -

primeros en estudiar más sistemáticamente las posibilidades para una adecuada supervivencia de trasplantes de neuronas periféricas y centrales en el SNC de mamíferos adultos. (11,80) 73,74)

Culminando el acervo de los estudios anteriores con el trabajo de Backlund, Granberg y colaboradores (7) y de Madrazo, Drucker y colaboradores (54), en trasplante de médula adrenal al núcleo caudado en pacientes con enfermedad de Parkinson.

(2.96)

EL CEREBELO COMO SITIO RECEPTOR DE IMPLANTES NEOCORTICALES

Se han realizado varios estudios en trasplantes heterotópicos neocorticales a cerebelo en rata, investigándose la propensión - de estos trasplantes para recibir inervación aferente del tejido huésped. Siendo reportadas conexiones aferentes de vías nerviosas , en la proximidad inmediata del trasplante heterotópico, que normalmente no son específicos o no se encuentran relacionados con el tejido neural trasplantado.

Además, teniendo el cerebelo como órgano receptor se ha demostrado que el cerebro adulto es capaz de proveer aferentes y recibir eferentes de trasplantes neocorticales embrionarios - (30, 60, 61).

IMPLANTES DE CEREBELO HACIA NEOCORTEZA

Las investigaciones realizadas con implantes heterotópicos de tejido cerebeloso hacia cerebro, son igualmente escasas, perfeccionándose paulatinamente las técnicas para su manejo e implan-

tación (17,18,19), y lográndose mejores conocimientos sobre la determinación de los periodos de gestación para obtener el tejido donador (4,45,63), así como sobre su integración, desarrollo del tejido donador en el huésped y vascularización del implante en el huésped (5).

Sin embargo, trabajos detallados sobre las cuestiones mencionadas anteriormente únicamente se han reportado en trasplantes superficiales a neocorteza, no así a regiones profundas del cerebro como las que nosotros estudiamos (núcleo amigdalino y núcleo caudado).

Los experimentos realizados con trasplantes heterotópicos de cerebelo hacia áreas neocorticales han demostrado que la corteza cerebelosa se desarrolla tanto como lo hace in situ.

Sin embargo, únicamente llevaron una secuencia temporal estrecha los procesos migratorios, mientras que la diferenciación de las células de Purkinje y de las folias se retardaron inicialmente. En las partes profundas del trasplante y a lo largo de las porciones del trasplante confinadas a las capas profundas de la neocorteza, la capa granular externa se encontró asociada con vasos penetrantes profundos. Un patrón citoarquitectónico invertido se desarrolló como capas cilíndricas concéntricas alrededor de dichos vasos. En contraste se observaron foliación y laminación normales en las partes más superficiales del implante. Se observaron axones que discurrían entre el huésped y el trasplante, siendo especialmente pronunciados en los sitios

bajo la capa granular interna, la que parecía contener núcleos cerebelosos profundos (45,90)

Demostrándose con microscopía electrónica que las conexiones sinápticas normalmente presentes en la corteza cerebelosa, también se encuentran en el implante; con excepción de las fibras trepadoras, las cuales estaban ausentes (4).

Encontrando estos mismos investigadores en implantes que sobrevivieron en situación extraparenquimatosa, que la presencia de aferentes extracerebelosos no es necesario para la diferenciación organotípica y sináptica del implante.

Por otra parte, el volumen resultante del tejido implantado es dependiente de la edad gestacional del feto donador y los implantes cerebelosos tomados en etapa tardía de gestación inclusive muestran una reducción en su tamaño final (44).

Un dato interesante es que en trasplantes ortotópicos cerebelo-cerebelo en ratas a finales de la primera semana de edad, las células indiferenciadas trasplantadas de los donadores migran activamente en la corteza cerebelosa de los huéspedes y aparentemente se diferencian en células en cesta y granulares.

TRASPLANTE NEURONAL Y EPILEPSIA

Se ha dado inicio a la introducción de técnicas de trasplante neuronal como un método alternativo para el estudio de los mecanismos y del control de la actividad epiléptica.

Como lo ejemplifica el estudio de Buzsáki y colaboradores (13) ;quienes implantaron suspensiones celulares de la región del locus coeruleus o del hipocampo bilateralmente y en forma subcortical encontrándose deaferentada esta región, encontrándose protección contra los efectos de la picrotoxina (sustancia que impide el acoplamiento del GABA al canal de Cl⁻ en los sitios moduladores), en contraposición a los implantes ortotópicos de hipocampo que inclusive mostraron crisis espontáneas.

DESARROLLO PRENATAL Y POSTNATAL DEL SISTEMA CEREBELOSO EN LA RATA

Los estudios de Altman y Bayer sobre el desarrollo prenatal normal del cerebelo de la rata, provee información acerca del grado de maduración de los fragmentos de la vasícula metencefálica que fueron usadas como implante cerebeloso (3).

Durante el desarrollo embrionario, el esbozo cerebeloso se inicia como dos yemas separadas (los labios rómbicos) a cada lado del cuarto ventrículo, empezando a diferenciarse en E13, principiando a fusionarse a lo largo de la línea media en E15.

Estos autores notaron que la migración de la capa granular externa iniciaba su migración rostral del trigono germinal en E 17. In situ, dicha capa exhibe su máxima actividad neurogénica en P8 y alcanza su grosor máximo en P10 a P11.

La capa molecular, la cual refleja la diferenciación de fibras paralelas de las células granulares en su migración de la capa granular interna aparecen en P6 a P8.

El árbol dendrítico de las células de Purkinje contribuye grandemente a la formación de la capa molecular.

Como consecuencia final de la morfogénesis de las células granulares, la capa granular interna inicia su formación en P4 a P6, con un máximo de diferenciación entre P8 y P16.

Las neuronas de los núcleos cerebelosos profundos son generadas por la zona germinal ventricular en E 13 a E14, mientras que la génesis de las células de Purkinje principian en E14, su migración es observada en E17 a E22, formando una monocapa en P4 a P6 y alcanzando el máximo tamaño en su soma en P22 (3).

El momento para la diferenciación y crecimiento de las células preciso para cada especie, pero puede variar considerablemente entre ellas y aún entre las diversas áreas del cerebelo de una misma especie. (Tabla I, Figura 1)

De manera que específicamente para la rata se ha considerado de acuerdo con diferentes autores un número total de células de Purkinje que va de 278 000 a 547 413 con una densidad por mm² de 93 a 1014. (36).

La secuencia descrita anteriormente en relación al desarrollo del cerebelo durante la gestación, como ya se ha descrito, se continúa aún en la vida postnatal culminando con la maduración total de este órgano.

Las primeras referencias de la anatomía macroscópica de la rata adulta las podemos encontrar en las publicaciones de Bradley (1904), Bolk (1906), Ingvar (1919), Riley (1928), Shotlen (1940) y Aciron (1951). El desarrollo y la configuración de los lóbulos y lobulillos del cerebelo de la rata fueron descritos por Larsell (1952, 1970).

La fisura profunda primaria separa el lóbulo anterior del lóbulo posterior.

TABLA I

DESARROLLO DEL CEREBELO NORMAL DE LA RATA

Evento morfológico	In situ
CGE	
Génesis	E17
Tamaño máximo	P10-11
Cesación	P17-22
Capa molecular	
Formación inicial	P 6-8
Grosor máximo	P22
CGI	
Formación inicial	P 4-6
Neurogénesis máxima	P11-12
Migración final	P22-24
Células de Purkinje	
Génesis	E14-16
Migración	E17-22
Agregación	E18-20
Monocapa	P 4-6
Máximo tamaño del soma	P22
Foliación	
Inicial	E16-18

E,día embrionario,positividad espermática=E1; P,día postnatal,
Nacimiento=P1; gestación=22 días

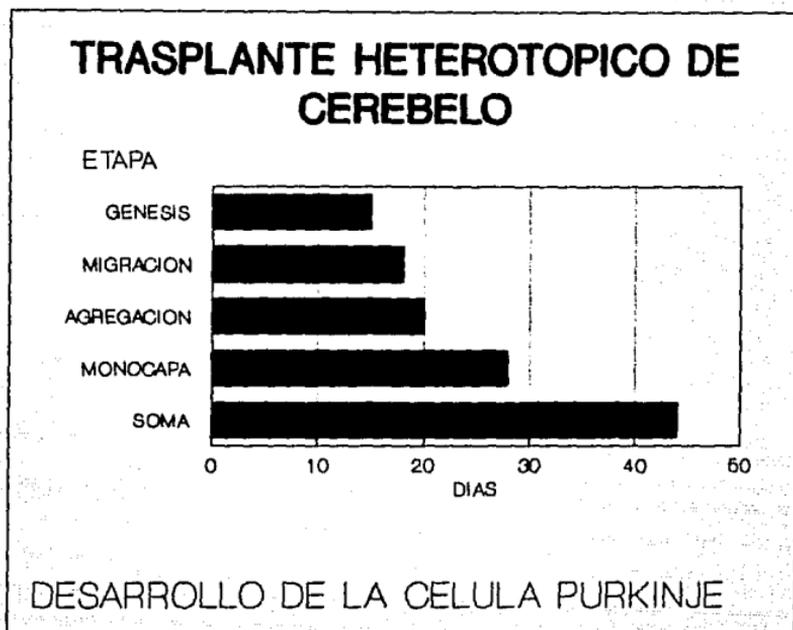


FIGURA 1

Este autor subdividió al cerebelo de la rata en 10 lobulillos , numerados del 1 al 10 en sentido rostrocaudal.

Los núcleos centrales se encuentran subdivididos de acuerdo a Ohkawa (1957), quién perfeccionó el esquema propuesto por Weidenreich (1899).

Estos autores dividieron los núcleos centrales en dos grupos de núcleos interconectados. El grupo caudal consiste del núcleo cerebeloso medio o fastigial y del núcleo interpuesto posterior ; el grupo rostral consiste del núcleo interpuesto anterior y del núcleo cerebeloso lateral o núcleo dentado. (88)

Ya que para nosotros era de especial interés la obtención de células viables de la corteza cerebelosa cuyos componentes celulares pudieran diferenciarse y ser funcionalmente útiles, ahondaremos en la descripción de ésta.

La corteza cerebelosa es una estructura uniforme en todas sus partes. Está compuesta por 3 capas bien definidas que contienen varios tipos diferentes de neuronas y que a partir de la superficie son: la capa molecular, la capa de células de Purkinje y la capa granulosa.

Las pequeñas células nerviosas en la capa granular, las células granulares envían sus axones hacia la superficie dentro de la capa molecular, donde se dividen semejando una letra T, en dos largas ramas que corren paralelas al eje longitudinal de la folia. Estas fibras paralelas forman la mayor parte de la capa molecular. Las fibras paralelas atraviesan los campos dendríticos de las demás células de la corteza cerebelosa y establecen sinapsis con ellas.

Los cuerpos de las células de Purkinje forman una monocapa que descansa sobre la capa granular.

Estas extienden hacia la capa molecular una elaborada arborización dendrítica. El axón de las células de Purkinje deja el pericarión a partir del polo opuesto a las dendritas y desciende a través de la capa granular a la sustancia blanca, de aquí procede a su destino en uno de los núcleos centrales o vestibulares.

La célula de Purkinje es la única neurona en la corteza cerebelosa cuyos axones se proyectan más allá de los confines de la corteza.

Justamente por encima de los cuerpos de las células de Purkinje se encuentra una célula de tamaño intermedio - la célula en cesto - la cual radia dendritas a través de la capa molecular, pero proyecta su axón horizontalmente en el plano parasagital arriba de la capa de células de Purkinje. Durante su trayecto, el axón pasa sucesivamente a los cuerpos de las células de Purkinje, manda colaterales que descienden alrededor del pericarión de las células de Purkinje, formando con axones de otras células similares un cesto pericelular. Las fibras establecen sinapsis con el cuerpo celular en el segmento inicial del axón de las células de Purkinje.

Células un poco más pequeñas que radian dendritas - las células estrelladas - se encuentran localizadas en la porción más alta de la capa molecular. Ellas extienden sus axones y colaterales -

para terminar en las espículas de las dendritas de las células de Purkinje. Estos dos tipos de células reciben conexiones de las fibras paralelas.

En la capa granular otros dos tipos de células se encuentran. La célula de Lugaro, descansa horizontalmente justo por debajo de las células de Purkinje. Sus dendritas son muy largas y están conectadas principalmente con recurrentes colaterales del axón de células de Purkinje. Su axón, tanto entra en la capa molecular como puede descender a través de la capa granular. Sus terminales no están determinadas.

La otra gran neurona de la capa granular es la célula de Golgi, la cual recibe aferentes de las fibras paralelas a través de sus largas y radiadas dendritas, las cuales establecen sinapsis con las dendritas de numerosas células granulares a través de un extraordinario plexo axonal.

Las vías aferentes a la corteza cerebelosa se pueden clasificar en dos grandes clases de fibras nerviosas: fibras trepadoras y fibras musgosas.

Ambos tipos dan colaterales a los núcleos centrales. Las fibras trepadoras se originan en gran parte de la oliva inferior contralateral, ramificándose en la capa granular, estableciendo sinapsis tanto con las células de Golgi como con las granulares y ascienden a la capa molecular.

Aquí se dividen en un plexo terminal alrededor de los troncos principales del árbol dendrítico de las células de Purkinje. Pequeñas ramas también se articulan con células en cesto y estrelladas.

Las demás aferentes a la corteza cerebelosa -vestibular, espinal, bulbar, reticular, pontina, etc.- aparentemente terminan como fibras musgosas. Estas se ramifican únicamente en la capa granular y establecen sinapsis por medio de rosetas con las células granulares y de Golgi.

Dado que el objeto primordial del presente trabajo es el de desarrollar un método adecuado de trasplantar tejido cerebeloso a núcleo amigdalino y a núcleo caudado; solo diremos en relación a los sitios de origen y de destino de las fibras aferentes y eferentes del cerebelo, que no se conocen a la fecha relaciones de este órgano con el núcleo amigdalino y se sugiere una relación indirecta con el núcleo caudado a través del sistema serotoninérgico de los núcleos del rafe pontino, recibiendo además, probablemente aferentes del núcleo caudado vía la oliva inferior a través del pedúnculo inferior (36,65).

NEUROQUIMICA DEL GABA

Los aminoácidos son cuantitativamente probablemente el grupo más importante de neurotransmisores en el cerebro de mamífero.

Los dos aminoácidos transmisores inhibidores mejor estudiados son el ácido gama-aminobutírico (GABA) y la glicina.

El GABA parece ser un transmisor inhibidor importante en todas las partes del SNC, mientras que la función inhibidora de la glicina se encuentra principalmente limitada al bulbo y a la médula espinal.

El GABA es una de las sustancias neuroactivas más ampliamente distribuidas en el SNC. Su concentración total en el cerebro (aproximadamente 2 micromoles/gr de tejido) es de por lo menos 200 a 1000 veces mayores que la de otros neurotransmisores.

La más alta concentración del GABA se encuentra en el globus pallidus y en la sustancia nigra. Sin embargo, es interesante que estas zonas tienen solo 3.5 veces más GABA que aquellas de menor contenido, mientras que en el caso de otros transmisores la diferencia entre zonas llega a 30,40 o más veces.

Prácticamente no existe ninguna región del SNC que se haya estudiado en la que el GABA no inhiba la actividad eléctrica neuronal cuando se aplica iontoforéticamente, puede concluirse que de todos los neurotransmisores conocidos es muy probable

que el GABA sea el más abundante y más profusamente distribuido en cuanto a función sináptica.

En el cerebelo las células de Purkinje, las estrelladas, las células en cesto y las de Golgi se han identificado como gabaérgicas.

Una vez que es liberado el GABA, este aminoácido tiene que alcanzar a la célula blanco.

Virtualmente todas las neuronas son sensibles al GABA, y los receptores de GABA están distribuidos en todo el cerebro.

Estos receptores pueden ser separados en aquellos que son sensibles a la bicuculina (GABA A) y en aquellos que no lo son (GABA B).

Aunque en términos generales la activación de los receptores GABA A son responsables de la clásica inhibición postsináptica, se ha mencionado que los receptores GABA A pueden ser separados en receptores sinápticos y extrasinápticos, los cuales hiperpolarizan despolarizan neuronas respectivamente.

El receptor GABA A se encuentra relacionado con el ionóforo de Cl⁻.

Algunos de estos receptores parecen estar acoplados a sitios moduladores. En estos sitios, drogas como las benzodiazepinas y la picrotoxina (la forma activa de la picrotoxina) pueden actuar para modificar el efecto del GABA en el canal de Cl⁻.

En cuanto al receptor GABA B actúa reduciendo la liberación de otros neurotransmisores como a la norepinefrina, glutamato,

dopamina o serotonina, El receptor GABA B puede trabajar disminuyendo la entrada de Ca^{2+} dentro de la terminal presináptica nerviosa.

Los sitios GABA A se piensa que sean en su gran mayoría postsinápticos y se encuentran concentrados en neuronas centrales y en neuronas simpáticas periféricas; mientras que los sitios GABA B, están en terminales presinápticas autonómicas y en terminales nerviosas centrales.

DISFUNCION DE SISTEMAS GABAERGICOS

Debido a la amplia distribución de terminales gabaérgicas en el cerebro, uno podría esperar que la disfunción de estos sistemas puede causar diversos efectos patológicos.

Existen numerosos ejemplos donde cambios específicos localizados en el sistema GABA están asociados con patología

La neurobiología de la epilepsia es complicada, pero el GABA y los ácidos amino acídicos se encuentran seguramente involucrados en ella. Diferentes modelos animales de epilepsia muestran disminución de GABA o de GAD en el foco epiléptico. Algunas muestras humanas tomadas en la región del foco también muestran disminución de GABA.

En la enfermedad de Huntington existe reducción en los niveles de GABA en los ganglios basales, al igual que en el hemibalismo, que presenta los mismos hallazgos en el núcleo subtalámico y en el globo pálido.

Disminución de GABA en ganglios basales y en LCR se ha encontrado en pacientes no tratados con Parkinson.

Asimismo se han encontrado niveles bajos de GABA plasmáticos y en LCR en pacientes con depresión. (14,,32,40,41,50,51,57,62, 70,76,85).

4. OBJETIVOS

Los objetivos que nos hemos trazado en el presente estudio son los siguientes:

1. Lograr el desarrollo de un método experimental, con una técnica quirúrgica propia, útil para el trasplante neural intracerebral
2. Aplicar el método desarrollado, en trasplante neural heterotópico empleando donadores fetales de 14 a 16 días de gestación y receptores machos adultos de 250 gr a 300 gr de ratas Wistar. Implantando tejido cerebeloso fetal a núcleo amigdalino, a ventrículo lateral y como control a núcleo caudado de los receptores.
3. Tener la posibilidad de monitorización electrofisiológica y/o instalar un sistema de tipo "pushu-pull" directamente en el sitio implantado.
4. Contar con la posibilidad de monitorizar otros sitios del cerebro del animal en forma simultánea.
5. Demostración histológica e inmunohistoquímica de la super-

vivencia, integración y funcionalidad del implante realizado.

4. Ulteriormente, una vez logrado el método de implantación se planea continuar en otra etapa con el registro de los cambios observados en los animales implantados a los cuales se desarrollará un modelo de epilepsia experimental.

MATERIAL Y METODO

"¿Tienes una teoría? "Si, una provisional. Pero no me sorprenderé si no es la correcta".

A.C. Doyle

5.a MATERIAL

El material empleado se refiere a continuación:

1. Se utilizaron ratas Wistar adultas, machos entre 250 gr y - 300 gr como receptores; como donadores, fetos de la misma especie que se encontraran entre 14 a 16 días de gestación.

2. Instrumental quirúrgico:

- a. Bisturí
- b. Hojas de bisturí No. 11 y 20
- c. Pinzas de disección
- d. Pinzas Adson
- e. Pinza Kelly
- f. Disectores
- g. No se contó con instrumental de microcirugía

3. Para la ejecución de este proyecto se empleó el instrumento de estereotaxia David Kopf modelo 1404.

4. Pieza de baja velocidad de odontólogo, Foredom modelo 21.

5. Fresas Meisinger 1/014 No. 4.

6. Las cánulas guía y de microinyección fueron diseñadas y elaboradas en este laboratorio con las siguientes especificaciones:

a. Cánula guía dirigida a núcleo amigdalino, núcleo caudado y ventrículo lateral:

Tipo de material: Aguja hipodérmica de acero inoxidable

Dimensiones: Calibre 18; longitud-13 mm

b. Mandril de la cánula guía:

Tipo de material: Aguja hipodérmica de acero inoxidable

Dimensiones: Calibre 22; longitud-14 mm

c. Cánula de microinyección:

Tipo de material: Aguja hipodérmica de acero inoxidable

Dimensiones: Calibre 22; longitud-20 mm

7. Los electrodos utilizados para practicar lesión electrofónica fueron manufacturados en este laboratorio.

Características: Electrodos bipolares con separación de 1-mm de punta a punta. Sin barniz aislante en 0.5 mm a partir de sus puntas.

Tipo de material: Alambre de acero inoxidable aislado con

barniz

Dimensiones: longitud-20 mm

8. Lesionador GRASS de corriente directa, modelo DC LM 5A.

9. Catéter de microinyección

Tipo de material: Polietileno (Biotrol)

Dimensiones: No. 1. ϕ interno-0.30 mm, ϕ externo-0.70 mm

10. Microjeringa Hamilton

Especificaciones: 10 microlitros

11. Microscopio de disección estereoscópico con base

Especificaciones: Stereo Star Zoom Reichert 1x a 6x 580. -

Bajo un aumento de 10 x

12. Microtomo Sartorius-Werke, modelo 27**13. Otros implementos:**

- a. Cajas de Petri
- b. Vidrio de reloj
- c. Portaobjetos y cubreobjetos
- d. Tornillos finos de acero inoxidable
- e. Acrílico autopolimerizable
- f. Perforador para marcaje de las ratas
- g. Tanques de CO₂ para cortes por congelación
- h. Servicio de Bioterio

14. Soluciones:

Solución de NaCl al 0.9%

15. Fijador:

Formol al 10% + heparina

Formol al 10%

16. Soluciones y reactivos para tinción

- a. Cresil violeta acetato
- b. Alcohol a diferentes concentraciones (etílico).
- c. Agua destilada,
- d. Xilol
- e. Acido acético

5.b METODO

El presente estudio se divide en dos etapas, la primera de ellas consiste en el desarrollo de un método experimental óptimo para la obtención e implante de tejido cerebeloso fetal a diferentes sitios del cerebro de la rata. (66,67)

Esta es probablemente la etapa más crítica de estos experimentos puesto que existe poca información en la literatura sobre el momento más oportuno del desarrollo embrionario en que debe realizarse la toma del injerto, el tratamiento previo que debe realizarse al tejido a trasplantar (bloques de tejido, suspensiones celulares, tratamientos enzimáticos, etc.), la cantidad de tejido a implantar (concentración celular), sobre el tipo de "medio de transporte" en que debe mantenerse el tejido en el lapso en que se obtiene y se implanta (solución fisiológica, glucosada, su temperatura, condiciones de oxigenación, etc.). Así mismo existen escasos conocimientos sobre el tipo de preparación que debe tener el receptor incluyendo la edad, sexo, los sitios cerebrales más adecuados para la incorporación del implante, la preparación misma del sitio a implantar (inoculación directa del tejido fetal, lesión por aspiración, lesión electrolítica, etc.), el tiempo que debe transcurrir entre la realización de la

lesión y el momento del trasplante. Por otra parte existen pocos estudios en relación a la interacción trasplante-huésped, huésped-trasplante y en cuanto al momento en que adquiere funcionalidad un tejido neural trasplantado, en este caso el cerebelo.

Por lo tanto tampoco existe suficiente evidencia sobre el momento óptimo de sacrificio de los animales de experimentación, ni el porcentaje de éxito en este tipo de trasplante.

De esta forma, cada una de las variables mencionadas constituye por sí misma un punto de estudio.

Las diferentes técnicas metodológicas difieren entre los diferentes centros de investigación.

Cabe mencionar que en Iberoamérica no se han reportado estudios sobre trasplante de tejido cerebeloso a cerebro.

La segunda etapa de este proyecto consiste en la verificación de la viabilidad del tejido trasplantado.

Como una tercera etapa, que se desprende directamente de este trabajo y que ulteriormente se realizará, es el estudio de la funcionalidad del tejido implantado y su aplicación a un modelo experimental de epilepsia.

METODO

EXPERIMENTOS PRELIMINARES

Previamente a la ejecución de implante de tejido cerebeloso se realizaron varios experimentos y prácticas con el objeto de adquirir precisión en cada una de las diferentes fases en que se encuentra diseñado este estudio.

1. En primer lugar se seleccionaron ratas adultas Wistar para diseccionar bajo microscopio la fosa posterior y obtener familiarización con dicha área.

2. Una vez que se logró realizar el procedimiento quirúrgico en forma adecuada, se prosiguió con el mismo trabajo con ratas recién nacidas.

3. Posteriormente se practicó operación cesárea en ratas Wistar a finales del período gestacional; exponiéndose los cuernos uterinos extrayéndose los fetos, realizándose la disección de la fosa posterior, obteniéndose bajo microscopio de disección tejido cerebeloso. Este mismo procedimiento se efectuó finalmente con embriones de 14 días de gestación.

4. Se seleccionaron ratas adultas Wistar que pesaron entre 250 gr y 300 gr con las que se practicó la correcta posición de éstas en el instrumento de cirugía estereotáxica, a las cuales

se colocó cánula guía dirigida estereotáxicamente, practicándose lesión electrolítica, inyectándose como colorante azul de pontamina dentro de la cavidad formada por dicha lesión. Esto es en núcleo amigdalino, núcleo caudado y ventrículo lateral, todos del hemisferio cerebral derecho.

Dichas ratas fueron sacrificadas, realizándose perfusión transcárdica a gravedad, lavándose el cerebro y fijándolo en formol, para hacer posteriormente cortes por congelación, tiéndolos. Corroborándose así la precisión del sitio lesionado; corrigiéndose en su caso, mediante la repetición de este proceso las coordenadas en el instrumento de cirugía estereotáxica; así como las características del amperaje y duración de la corriente con la que se hizo la lesión electrolítica; igualmente se llevaron a cabo modificaciones de los electrodos usados; de la cánula guía, de la cánula de microinyección; y del tiempo adecuado para realizar un implante heterotópico de tejido cerebeloso; del mismo modo se seleccionó el tipo de material para que se adecuara de manera más propicia a este fin.

Los detalles técnicos se describirán más adelante.

5. Se llevaron a efecto diversas prácticas para lograr una óptima recolección del material a implantar con microjeringa y su cánula de microinyección.

6. Se experimentó con varios anestésicos hasta obtener el de mayor utilidad .

7. Se realizaron en repetidas ocasiones perfusiones en ratas-

adultas para adquirir especímenes adecuados y tener mejor calidad en cortes y tinciones.

8. Se obtuvo adiestramiento en el uso del microtomo.

9. Así como en las técnicas de montaje y tinción de cortes cerebrales.

METODO EXPERIMENTAL**PRIMERA ETAPA****FASE A. PREPARACION DEL RECEPTOR**

1. Se utilizaron ratas macho Wistar con peso entre 250 gr y 300 gr.
2. Se anestesiaron con Ketamina, a una dosis de 200 mg/kg de peso, efectuándose rasurado de la cabeza del animal, prosiguiendo con antisepsia del área.
3. La rata es posicionada en el instrumento de cirugía estereotáxica de la manera siguiente:
 - a. Los lápices son colocados en los conductos auditivos.
 - b. Se sitúa el adaptador de rata (sujetador bucal) por detrás de los incisivos superiores.
 - c. El cráneo es inmovilizado por medio de la horquilla del adaptador de rata.
4. Es practicada una incisión medial sagital de la piel, tejido celular subcutáneo y galea hasta el pericráneo, separándose los bordes de la herida quirúrgica lateralmente. Se identifica Bregma (punto de unión de los huesos parietales con el frontal).
5. La cánula guía es colocada en la torre estereotáxica y se sitúa en bregma.
6. Se leen las coordenadas antero-posteriores y laterales.

7. Se realiza una suma algebraica con respecto a las coordenadas referidas en el Atlas Estereotáxico del Cerebro de la Rata (Pellegrino y colaboradores) para localizar el sitio blanco, siendo las siguientes coordenadas, en relación al atlas para cada uno de los 3 grupos:

a. Ratas a las que se practicó implante en núcleo amigdalino derecho.

Antero- Posterior (AP) = -1.0

Lateral (L) = 4.0

Vertical (V) = 7.0

b. Ratas a las que se practicó implante en núcleo caudado derecho.

AP = 1.6

L = 3

V = 5

c. Ventrículo lateral derecho.

AP = -2.8

L = 1.0

V = 3.5

Dependiendo estas coordenadas de Bregma en el plano horizontal.

8. Se practican tres agujeros de trépano con fresas, usando para tal efecto una pieza de baja velocidad para odontólogo, haciendo uno de ellos en el sitio por donde se introducirá estereotáxicamente la cánula guía, y otros dos agujeros de trépano contralaterales, en los cuales se colocarán tornillos

- invertidos que ayudarán a fijar el acrílico que inmovilizará a la cánula guía al final de esta fase.
9. La duramadre es dejada al descubierto en cada trépano limpiando los residuos óseos.
 10. Los tornillos se colocan en posición invertida epidural - mente.
 11. Se realiza apertura de la duramadre en el sitio de implantación de la cánula guía.
 12. Se introduce la cánula guía de acuerdo con las coordenadas verticales. La que finalmente quedará situada por encima de - la cavidad realizada por la lesión electrolítica.
 13. A través de la misma cánula se introduce el electrodo bi - polar de acero inoxidable, ya colocado el electrodo, su extre - mo intraparenquimatoso sobresale de la cánula guía; su extre - mo extracraneal posee una marca que establece un tope con la cánula guía y que evita una introducción accidental más pro - funda.
 14. Procedemos entonces a realizar lesión electrolítica de 2 mA con una duración de 10 segundos. Siendo la lesión resultante - de aproximadamente 1.5 mm de diámetro.
 15. Es retirado el electrodo.
 16. Posteriormente, a través de la cánula guía, se pasa la cánu - la guía se pasa la cánula de microinyección con el fin de - calibrarla de acuerdo con las coordenadas verticales, se mar - ca la longitud correcta y es retirada.

17. Se deja la cánula guía y se fija con acrílico, recubriéndola al igual que a los tornillos.
18. Se introduce el mandril de la cánula guía. (Figura 2)
19. Se sutura la piel.
20. Se marca al animal.
21. Los puntos 13, 14 y 15 no se realizan en el grupo de implante ventricular.

Los animales son aislados y observados en cámaras separadas - hasta su recuperación total del procedimiento quirúrgico. Después son llevados al Bioterio en donde permanecen entre 7 a 10 días - al término de los cuales son sometidos a implante de tejido cerebral fetal.

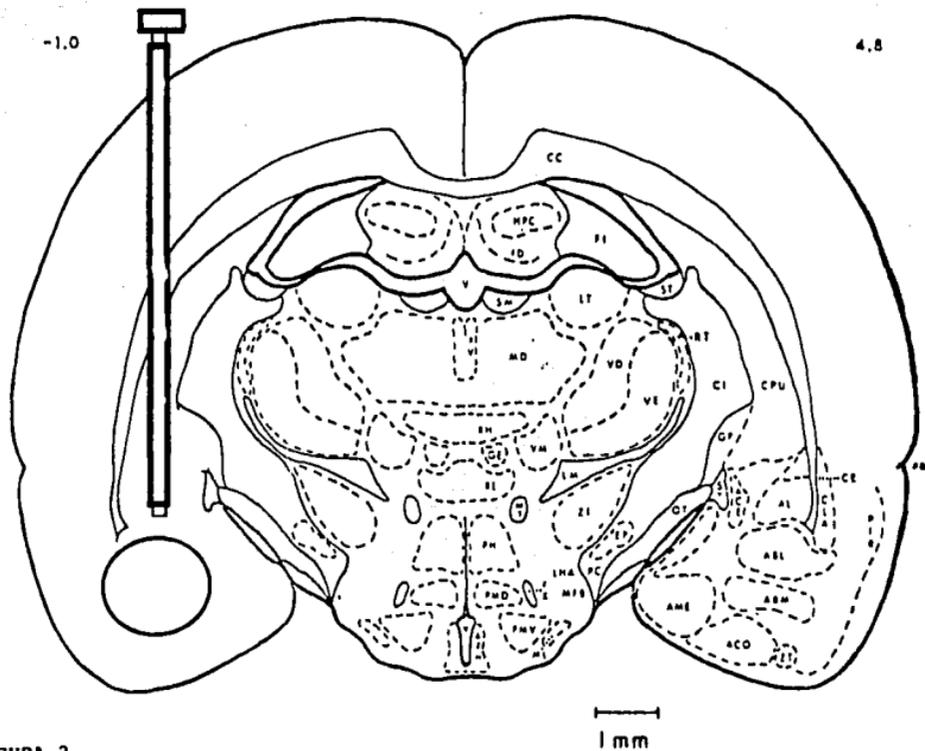


FIGURA 2

FIGURA 2

La cánula guía, con el mandril en su interior es dejada a permanencia por arriba del sitio de lesión, en este caso el núcleo amigdalino.

Abreviaciones:

ABL: Núcleo amigdalino basal, pars lateralis.

ABM: Núcleo amigdalino basal, pars medialis.

ACO: Núcleo amigdalino corticalis.

AME: Núcleo amigdalino medialis.

ZT : Zona transicional de la amígdala.

Nota:

Con fines ilustrativos se ha dibujado la colocación estereotáxica de la cánula guía en el hemisferio izquierdo.

Dicho procedimiento se efectuó en el hemisferio cerebral derecho del animal de experimentación.

METODO EXPERIMENTAL

PRIMERA ETAPA

FASE B. PREPARACION DEL DONADOR

EDADES GESTACIONALES

Para llevar a efecto esta fase se separaron ratas hembras Wistar por más de 20 días, cerciorándonos de esta forma que no estuvieran preñadas.

En forma individual fueron colocadas en una cámara de observación con un macho; se verifica la copulación y se corrobora la presencia de tapón vaginal.

Tomamos este momento como día cero de gestación (E0), de igual manera a como lo han considerado Kromer y colaboradores (44,45)

El día de nacimiento de los productos de nuestras ratas varió entre 21 a 23 días de gestación (E21 a E23).

Se seleccionaron como donadores a los embriones que se encontraban entre los días 14 y 16 de gestación (E14 a E16).

Cuando no fué posible realizar el control directo de la copulación; se seleccionaron ratas gestantes cuyos productos medían entre 14 mm a 16 mm, de acuerdo con la correlación edad gestacional-longitud coronal caudal reportada por Seiger y Olson, y por Kromer, Björklund y Stenevi (44,45,77), (Tabla II) (Fig. 3)

**CORRELACION DE EDAD GESTACIONAL Y
LONGITUD CORONAL-CAUDAL**

Día embrionario ¹	E G - C C	No. de ratas gestantes ²
12	6-7 mm *	1
13	8-11mm *	2
14	12-15mm *	3
15	16-17mm *	2
16	16-18mm *	7
17	20-21mm *	2
18	24-26mm ***	
19	26-30mm ***	

1 Día de tapón vaginal equivale a día embrionario coro (E 0)

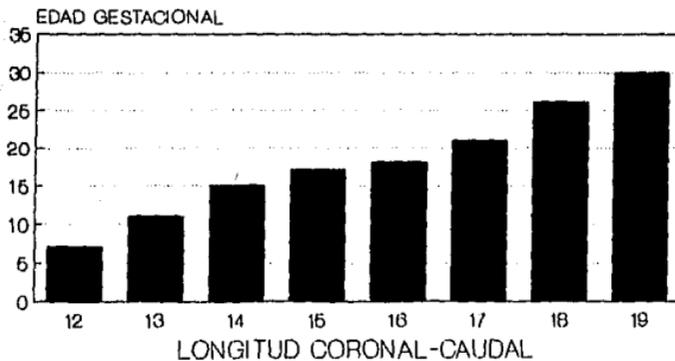
2 El número de productos varió entre 9 y 17 cachorros

* Kromer, Björklund y Stenevi

***Seiger y Olson

TABLA II

TRASPLANTE HETEROTOPICO DE CEREBELO



CORRELACION EDAD-LONGITUD

FIGURA 3

OBTENCION DE EMBRIONES DONADORES

La obtención de los embriones donadores se efectuó de la manera siguiente:

1. Anestesiámos a la rata gestante con Ketamina, a razón de 200 mg/kg de peso.
2. Se rasura la región abdominal y se practica antisepsia de la región.
3. Es realizada operación cesárea de la rata gestante, exponiéndose ambos cuernos uterinos.
4. Iniciando por los extremos, se extrae cada embrión por separado, teniendo el cuidado de reincorporar al resto de los productos a la cavidad abdominal de la madre, con el fin de no alterar la circulación materno-fetal ni la temperatura a que se encuentran los embriones.
5. El embrión obtenido se coloca en una caja de Petri con solución salina a temperatura ambiente.
6. En dicho sitio el embrión es decapitado y la cabeza colocada bajo microscopio de disección.

OBTENCION DE TEJIDO CEREBELOSO

1. Proseguimos disecando la fosa posterior del embrión bajo un aumento de 10x. Se retiran meninges u otros tejidos adyacentes al área hasta identificar el esbozo del cerebelo del embrión.
2. En embriones que se encuentran en E14, el tejido cerebeloso donador es disecado de la parte lateral del esbozo cerebeloso en forma bilateral; en embriones de mayor edad gestacional el tejido se toma cercano a la línea media.

METODO EXPERIMENTAL

PRIMERA ETAPA

FASE C. IMPLANTACION DE TEJIDO CEREBELOSO

1. El tejido cerebeloso a implantar es colocado en una gota de solución salina a temperatura ambiente que se ha dispuesto previamente sobre un portaobjetos.
2. El procedimiento anterior se practica en dos embriones do-

nadores, reuniendo ambos cerebelos en el portaobjetos en la forma ya descrita

3. A continuación se corta el tejido cerebeloso con un instrumento punzo-cortante fino, disgregándolo.
4. Mediante aspiración y expulsión repetidas del tejido a implantar a través de la cánula de microinyección conectado mediante un catéter a la microjeringa Hamilton de 10 microlitros se logra homogeneizar la preparación del tejido embrionario.
5. Se aspiran de 5 a 8 microlitros del tejido en la microjeringa.
6. Se toma al animal receptor, retirándose el mandril de la cánula guía.
7. Encontrándose alerta la rata receptora, se introduce la cánula de microinyección y se inyectan de 5 a 8 microlitros del tejido cerebeloso lentamente, en el lapso de 1 a 2 minutos; durante este paso el animal de experimentación puede encontrarse en libre movimiento. (Figura 4)
8. Una vez que se ha terminado de inyectar el material de implantación, se mantiene la cánula de microinyección dentro de la cánula guía por espacio de 1 a 2 minutos; se retira la cánula de microinyección y se coloca posteriormente en su lugar nuevamente en mandril de la cánula guía.
9. La rata receptora es observada en una jaula individual, y una vez que se verifica que no ha sufrido deterioro neuro

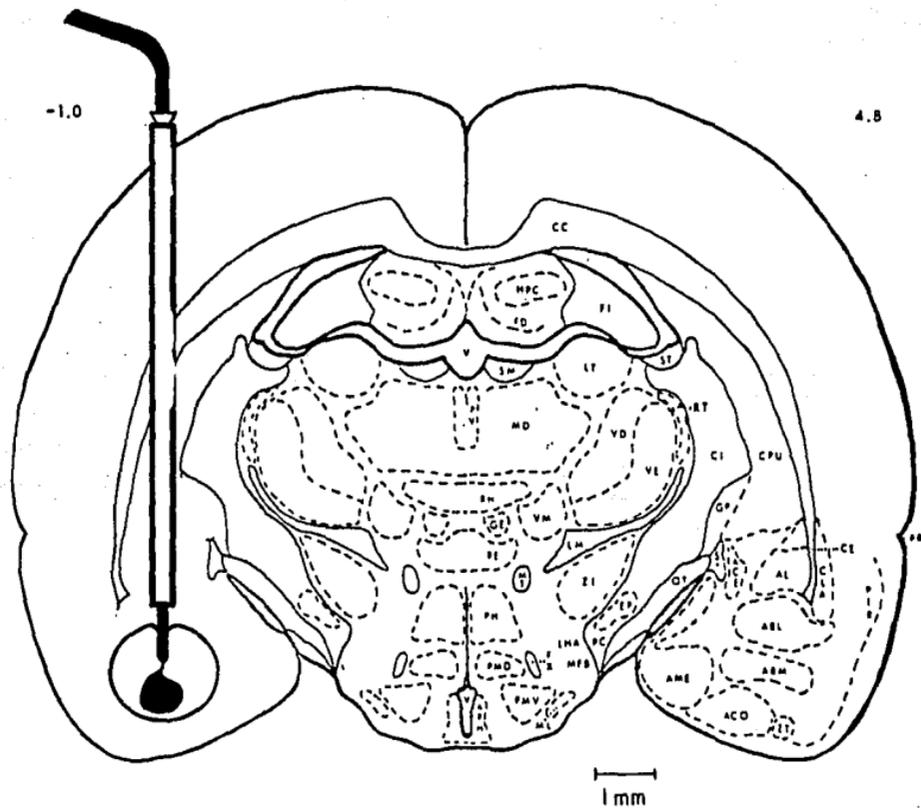


FIGURA 4

lógico es llevada al bioterio.

(Figuras 5,6,7 y 8)

METODO EXPERIMENTAL

SEGUNDA ETAPA

HISTOLOGIA

Se intervinieron más de 50 animales antes de lograr las condiciones idóneas de trasplante.

Después de haberse realizado el trasplante, los animales huéspedes fueron sacrificados en diversos intervalos de tiempo elegidos empíricamente para observar el desarrollo del implante.

Finalmente, como grupo piloto, se recogieron especímenes con 7 a 10 días entre la realización de la lesión y la implantación, 90 días posteriores al implante y con una P* de 83 días.

* Para lograr una mayor claridad, de acuerdo con el sistema empleado por Wells y McAllister, las edades referidas del tejido implantado en este estudio también se anotan de forma tal que - que la edad del implante al momento del sacrificio del animal - receptor, es la que tendría si al donador se le hubiera permitido vivir. En forma convencional se ha considerado que el nacimiento (en promedio 22 días después de la fertilización) sería el día postnatal 1 (P1). (90)

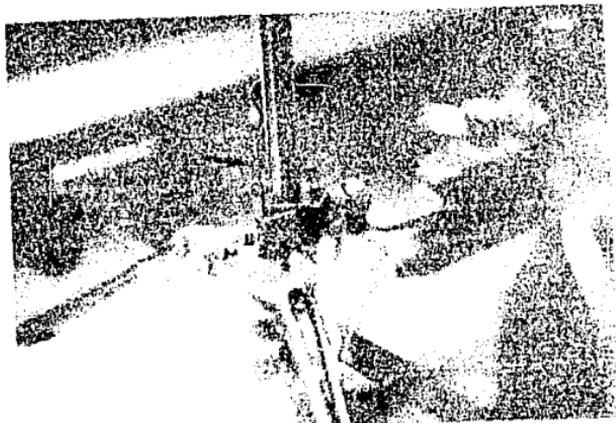


FIGURA 5.

El animal de experimentación se encuentra colocado en el instrumento de estereotaxia. Se han realizado las trepanaciones correspondientes, introducido la cánula guía y efectuada la lesión electrolítica. En esta imagen se ilustra la calibración de la cánula de microinyección, la cual es pasada a través de la cánula guía. Obsérvense los tornillos invertidos contralaterales.



FIGURA 6

Obtención de productos de 14 a 16 días de gestación.

FIGURA 7

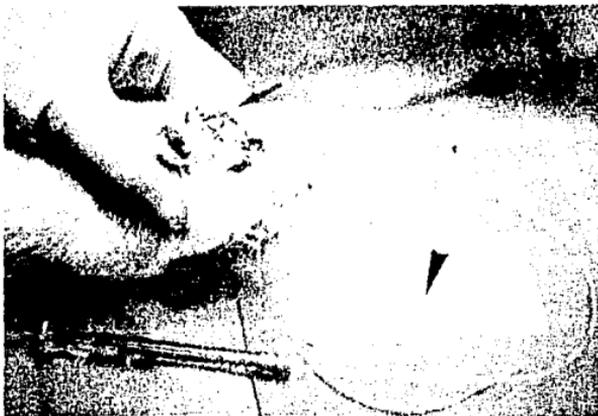


FIGURA 8



FIGURA 7

La rata es preparada para recibir el implante, la cánula guía tiene aún colocado su mandril (flecha).

El implante se encuentra en una gota de solución salina sobre un portaobjetos (punta de flecha).

Se observa el equipo de microinyección: Microjeringa Hamilton- conectada a la cánula de microinyección mediante un catéter de polietileno.

FIGURA 8

Se ha retirado el mandril de la cánula guía. Se ha introducido la cánula de microinyección en la cánula guía (flecha) y se implanta el tejido cerebeloso embrionario.

PREPARACION DEL CEREBRO RECEPTOR PARA HISTOLOGIA

Los animales elegidos fueron anestesiados en la forma anotada con anterioridad, y se les practicó perfusión transcardíaca con un sistema a gravedad.

Una vez efectuada la craniectomía a la rata de experimentación se extrajo el cerebro; el cual se fijó en formol al 10%.

Posteriormente se practicaron cortes por congelación con un grosor de 80 micras.

TINCION DE LOS CORTES HISTOLOGICOS

A los cortes por congelación se les hizo tinción de Nissl con violeta de cresilo.

Esta es la técnica usada clásicamente por los investigadores en la ayuda de localización de electrodos y/o lesiones. Hay un número considerable de tinciones satisfactorias de cresilo, esta es una combinación reportada con buenos resultados, y es además la técnica con que inicialmente preparan, por lo general sus cortes cerebrales los investigadores en esta rama de las neuro-

ciencias.

TECNICA DE TINCION

La tinción se efectuó de la siguiente manera:

Solución:

Cresil violeta acetato - 2 gr

Agua destilada - 1000 ml

[0.2%]

Procedimiento:

Secciones por congelación (montadas)

1. Alcohol 70%	2-3 minutos
2. Alcohol 80%	2-3 min
3. Alcohol 95%	2-3 min
4. Agua destilada	2-3 min
5. Tinción	7-15 min
6. Alcohol 95%	Lavar agitando
7. Alcohol 95%	Lavar agitando
8. Alcohol 95% más 25 gotas de ac. acético		

al 10%/200 ml de -

	a diferentes tiempos
alcohol absoluto	
9. Alcohol absoluto	2-3 min
10. Alcohol absoluto	2-3 min
11. Xilol	2-3 min
12. Xilol	2-3 min

RESULTADOS

"Allí está nuestro resultado y fue un análisis muy pequeño de un trabajo bien ejecutado.

A.C. Doyle

6. RESULTADOS

Los cortes histológicos fueron realizados a los 90 días de haberse implantado tejido cerebeloso en los núcleos amigdalino y caudado.

En cuanto a los animales implantados en el sistema ventricular, al no ser concluyentes aún los resultados se discutirán en una comunicación posterior.

De acuerdo con la información vertida en páginas precedentes, y de igual manera a como lo han descrito algunos investigadores en relación al trasplante de tejido cerebeloso en forma heterotópica podemos decir que:

La interpretación de la citoarquitectura fetal es difícil en tejido trasplantado a causa de que se desconoce la extensión del primordio cerebeloso que se obtuvo para ser implantado, así como por el método de homogeneización empleado.

Debido al gradiente posterolateral a anteromedial en la maduración cerebelosa normal, la disección regional y/o la implantación de tejido desorientado del cerebelo fetal, hace que la identificación precisa de las etapas tempranas de desarrollo sea casi imposible.

Este problema es incrementado por la apariencia similar de las células de Purkinje y de los neuroblastos de los núcleos

profundos.

Lo anterior sin contar con la posible contaminación con tejido conectivo tomado accidentalmente durante el procedimiento de disección del tejido fetal o su desarrollo a partir de capilares en desarrollo del propio huésped.

Además es lamentable no contar con estudios previos de trasplante de tejido cerebeloso a las áreas elegidas por nosotros, de forma que pudieramos comparar nuestros resultados.

DESCRIPCION MICROSCOPICA

Los implantes tienen forma lobulada, situados en el lugar previsto (núcleo amigdalino y núcleo caudado)

Presentan un límite con el tejido nervioso vecino formado en algunos sitios por macrófagos cargados de pigmento hemático y restos de hemoglobina.

No hay reacción fibrosa limitante y llama la atención que no existe gliosis

No existen espacios virtuales entre el huésped y el implante, encontrándose este último en íntimo contacto con el tejido adyacente.

Existen múltiples vasos capilares neoformados en el límite del implante, observándose igualmente en su interior. (Figura 9)

Es notable que no es posible reconocer en el interior del implante células completamente desarrolladas, existiendo, sin embargo tendencia a la maduración con diferenciación morfológica-funcional.

Básicamente hay un patrón heterogéneo celular, encontrándose áreas con concentraciones de un determinado tipo celular con otras áreas en que éstas se encuentran mezcladas.

Tres tipos celulares fueron identificados primordialmente.

El tipo celular predominante correspondió a las células de menor tamaño y más oscuras, que posiblemente correspondan a células de la capa granulosa.

En predominancia, el siguiente tipo celular, de tamaño mediano semejan a células de la capa molecular.

Se identificaron neuronas más grandes, algunas de ellas con núcleo grande y transparente, con abundante soma, algunas con bordes irregulares y cono citoplásmico triangular que pudieran corresponder a células de Purkinje. (Figuras 10 y 11)

Por otra parte no se observó tejido necrótico en el interior del implante, sin embargo se observaron algunos fibroblastos invadiendo pequeñas áreas del implante. (Figura 12)

FIGURA 9.

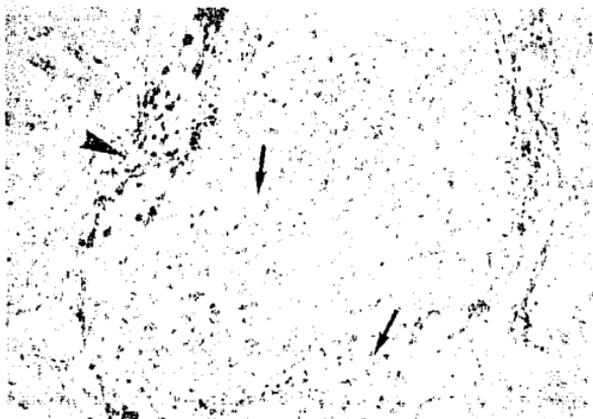


FIGURA 10.

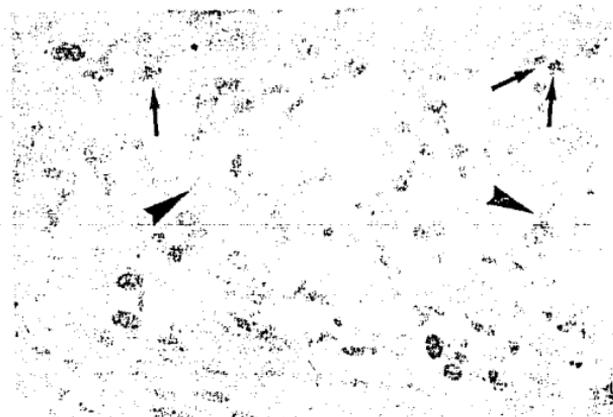


FIGURA 9.

Implante de tejido cerebeloso embrionario a núcleo amigdalino de forma lobulada, presenta un límite con el tejido nervioso - vecino formado en algunos sitios por macrófagos cargados de - pigmento hemático (punta de flecha). No existe gliosis. Se obser- van capilares neoformados en el límite del implante, así como en su interior (flechas). 10 x

FIGURA 10.

Las células más numerosas son las más pequeñas y oscuras, po- siblemente correspondan a células de la capa granulosa (flechas dobles). En predominancia el siguiente tipo celular, de tamaño - mediano pudieran ser células de la capa molecular en desarrollo (flecha). Las células de mayor tamaño, de soma abundante, núcleo - grande y cono citoplásmico triangular pudieran corresponder a - células de Purkinje (punta de flecha). 25 x

FIGURA 11.

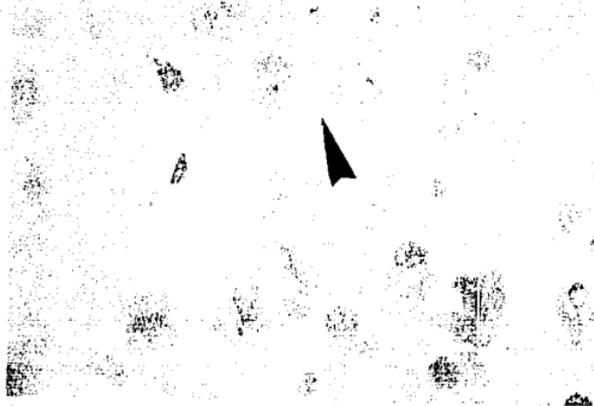


FIGURA 12.

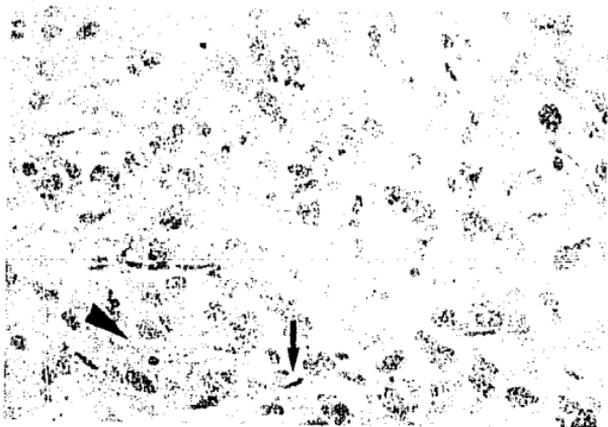


FIGURA 11.

Probables células de Purkinje a un mayor aumento (63 x).

FIGURA 12.

Se observaron algunos fibroblastos invadiendo pequeñas áreas del implante (flecha).

DISCUSION

"No desesperes ni siquiera por el
hecho de que no desesperas. Cuando
todo parece terminado, surgen nue-
vas fuerzas. Esto significa que vives."

Franz Kafka

7 DISCUSION

Se ha demostrado que el tejido embrionario y neonatal temprano puede sobrevivir implantado en la cámara anterior del ojo - (35,77,93,94), en el cerebro de mamíferos neonatales y jóvenes - (17,47,52,39) y en el cerebro de mamíferos adultos (31,45,81).

A partir de estos estudios es evidente que el tejido neural - embrionario de prácticamente todas las regiones del neuroaxis - pueden sobrevivir el trasplante, pero que el tamaño final y el - grado de diferenciación del tejido puede estar influido por diversos factores relacionados con el procedimiento de trasplante

Ha sido reportado que la supervivencia y el tamaño final del - implante se encuentra relacionado directamente con la edad del animal donador (19,31,63,77).

Los tejidos fetales de poca edad de gestación que contienen - neuroepitelio más indiferenciado producen un volumen mayor de - implante

También ha sido reportado que la localización del implante - dentro del huésped y la edad del huésped tienen algún efecto en el tamaño final del implante (31,81).

Estudios de la organización citoarquitectónica de implantes - con un largo tiempo de supervivencia en el cerebro sugieren que la organización celular puede ser afectada por: 1. la disrup -

ción mecánica del tejido durante el trasplante (39,45).
,2. variaciones en el procedimiento de disección, el tamaño original del tejido y muerte celular dentro del implante (39,45,81).
y 3. la pérdida de factores extrínsecos específicos, tales como -
aferentes específicas (17,80,93), 4. otro posible factor que influiría el desarrollo postimplantación de la organización intrínseca de los implantes embrionarios es la edad gestacional del -
feto donador al momento del trasplante (17,44,80). (Figura 13)

CONSIDERACIONES METODOLOGICAS

La información anterior subraya la importancia que tiene el -
diseño experimental.

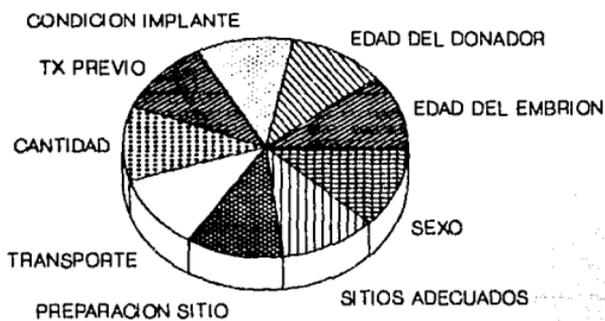
Nosotros hemos empleado como receptores ratas adultas macho -
Wistar entre 250 gr y 300 gr. Se han usado ratas Long-Evans y sobre todo ratas Sprague Dawley para los estudios de trasplante -
neural.

No parece ser este un factor importante pero cabe mencionarlo.

Se ha preferido que las ratas huésped sean machos con el fin de restringir factores hormonales que pudieran interferir en el implante.

Será de utilidad en estudios ulteriores el emplear como recep-

TRASPLANTE HETEROTOPICO DE CEREBELO



VARIABLES

FIGURA 13

tores ratas de la misma camada de las que se pueden formar distintos subgrupos de acuerdo con el momento elegido para su sacrificio, de manera que las variables de edad y peso de los huéspedes se estandaricen.

Asimismo se pueden tener grupos de receptores aún en desarrollo, lo que podría facilitar la aceptación del implante.

Los donadores que usamos tenían de 14 a 16 días de gestación. Una corrección al respecto será la obtención de productos únicamente de 14 días de gestación.

Se tendrán grupos de por lo menos 5 especímenes trasplantados de cada subgrupo.

Descripciones de una amplia variedad de técnicas usadas para implantar tejido en el cerebro pueden ser encontradas en la literatura.

El abordaje más simple y el que fué inicialmente usado consiste en insertar un injerto directamente en una hendidura hecha con pinzas finas o con instrumentos similares. Esta técnica fué usada con pobres resultados por Saltykow (1905) y del Conte (1907) en receptores adultos, y con resultados más positivos por Ranson (1914), Tidd (1932) y por Das y Altman (1971, 1972) en ratas en desarrollo.

Una variante de esta técnica, la cual da considerablemente mejor control sobre la colocación del trasplante y que permite el uso de piezas grandes de tejido, es colocar el tejido en una cavidad preparada quirúrgicamente. Esta fué empleada inicialmente

en la médula espinal seccionada, principalmente para trasplantes de nervio periférico - Sugar y Gerard (1940), Kao, et al (1976, 1970). Posteriormente fué adoptada para trasplantes de tejido neural en áreas corticales por Stenevi et al (1976, 1980) en el cerebro de la rata adulta, y por Lewis y Cotman (1980, 1983) y Graziadei y Kaplan (1980) en animales neonatales. La principal ventaja de este procedimiento es que la supervivencia del implante puede ser grandemente incrementada preparando la cavidad en una superficie ricamente vascularizada (por ejemplo la pia en la superficie coroidal) que puede servir como "lecho de cultivo" para el implante (Stenevi, 1976; Mollgaard, 1978)

Para áreas en las cuales no es posible tener tal superficie, Stenevi (1980) y Björklund (1980) diseñaron un procedimiento en dos etapas: Una cavidad es hecha inicialmente con una pipeta de succión y la herida es cerrada. Después de 4 a 6 semanas, cuando una pia nueva y ricamente vascularizada ha crecido sobre las superficies de la cavidad, ésta es abierta, limpiada y el trasplante insertado. Las observaciones hechas con esta técnica enfatizan la importancia de que los implantes obtengan una rápida y eficiente revascularización, particularmente cuando se trabaja con trasplantes de tejido neural en receptores adultos.

La inyección de piezas de tejido por medio de una jeringa ha sido usada de diferentes maneras. Esta técnica fué probablemente usada por primera vez por Le Gros Clark (1940). Más recientemente

este abordaje ha sido perfeccionado y usado con excelentes resultados por Das y colaboradores (1974,1980).

Una variación especial de este método fué introducido por Rosenstein y Brightman (1978,1979), siendo colocado el trasplante en los ventrículos cerebrales.

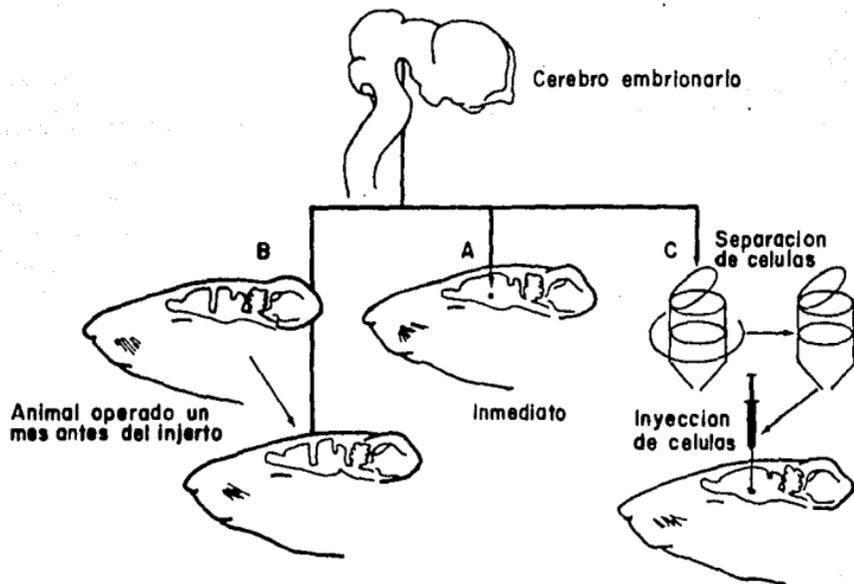
El tejido implantado en dicho sitio puede sobrevivir bien, sin embargo se requiere que el epéndima sea dañado para que el implante pueda fusionarse con el tejido adyacente y el injerto pueda lograr un buen volumen e interconexiones más extensas.

Más recientemente Björklund (1980,1983) y colaboradores, introdujeron una técnica en la cual es posible implantar neuronas centrales embrionarias en forma de una suspensión celular disociada. En este método, tejido embrionario es triptinizado y mecánicamente disociado en una suspensión celular lechosa. Pequeños volúmenes (1 a 5 microlitros) son inyectados estereotáxicamente en el sitio deseado del cerebro por medio de una jeringa Hamilton de 10 microlitros. (Figura 14)

Como puede verse, la técnica por nosotros empleada, es una combinación de varios procedimientos previos, en el sentido de que utilizamos instrumento de estereotaxia para inyectar tejido homogeneizado en una cavidad.

La diferencia estriba en que la cavidad es realizada por medio de una lesión electrolítica (técnica usada en otros laboratorios mexicanos), prefiriendo no tener una cubierta pial ya que ésta pudiera impedir el libre paso de terminaciones nerviosas -

FIGURA 14. TECNICA DESARROLLADA POR BJORKLUND (1980,1983)



entre el implante y el huésped y esperando que factores de crecimiento neuronal ayuden a la sobrevivencia del implante (existe un lapso de 7 a 10 días entre la lesión y la implantación) y que para estas fechas seguramente se haya establecido nueva vascularización en las paredes de la cavidad.

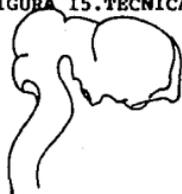
Dejamos a permanencia la cánula guía, que queda por encima de dicha cavidad y que no interferirá por lo tanto con el crecimiento del implante. Aunque desconocemos que importancia pueda tener el que sea un cuerpo extraño.

En realidad se realiza un tiempo quirúrgico (colocación estereotáxica de la cánula guía y realización de la lesión electrolítica), ya que la microinyección del tejido a implantar, se efectúa retirando el mandril de la cánula guía, encontrándose el animal de experimentación alerta, a diferencia de otros procedimientos de dos tiempos quirúrgicos. (Figura 15)

Ya que existe poca experiencia en trasplantes intraparenquimatosos se harán varios controles para poder comparar esta técnica, a saber:

1. Implantes de tejido cerebeloso a neocorteza con el fin de obtener mayor familiarización con el tejido fetal en desarrollo y su interacción con el huésped.
2. Implantes con menor cantidad de tejido a los sitios que hemos manejado pero sin realizar lesión previa.
3. También como control y con fines de estandarización de la técnica se pueden realizar implantes ortotópicos núcleo amigda-

FIGURA 15. TECNICA DE TRASPLANTE DESARROLLADA EN EL INNN.



Cerebelo embrionario
14 a 16 días de gestacion



Cerebro de la rata
(dibujo igual a A)

+

90 días



Diferenciación
Maduración



GABA



TRASPLANTE HETEROTOPICO DE

CEREBELO EMBRIONARIO

lino-núcleo amigdalino.

4. Se continuarán los experimentos con la implantación a sistema ventricular. Siendo importante lograr el implante en este sitio ya que el tejido implantado, al quedar en el sistema ventricular, será bañado por LCR, que puede ser un medio nutritivo suficiente para el implante en los primeros días postimplantación hasta que, a través de la capa ependimaria dañada, sea establecida nueva vascularización y el implante pueda fusionarse con el tejido cerebral adyacente, y en caso de ser funcional pueda posiblemente liberar neurotransmisores hacia las cavidades ventriculares y sean ampliamente difundidos con la circulación del LCR.

5. Otras posibilidades son el empleo de células cultivadas para implantarlas; el uso previo de tripsina o sustancias similares en el tejido a implantar, la deaferentación anatómica o química, el empleo de factores de crecimiento neuronal, uso de ciclosporina, etc. (12,48,87)

En relación a la técnica de obtención de tejido embrionario, sugerimos la utilización de un microscopio de disección de mayores posibilidades, así como instrumental de microcirugía, lo que facilitaría enormemente la disección de tejido fetal.

Otras modificaciones que podrían realizarse son la esterilización completa del material (nosotros esterilizamos la cánula guía y su mandril).

También puede utilizarse medio de cultivo tisular libre de suero (Hanks F-10, GIBCO, etc.) manteniéndolo en hielo durante el procedimiento de disección de los embriones.

El proceso de perfusión transcárdíaca del animal de experimentación, cuando es realizado por medio de la gravedad es bueno encontrándose el animal anestesiado, aprovechando el latido cardíaco. En otras condiciones quizás el método adecuado sea la utilización de una bomba de perfusión continua.

Los cortes por congelación han representado una gran ayuda durante el desarrollo de la presente técnica, siendo indispensables en la fase de verificación de la correcta localización de los sitios lesionados y presenta la ventaja de la observación rápida del implante.

Sin embargo, los artefactos propios de esta forma de corte, aunados a la capacidad de nuestro microtomo disminuye las posibilidades de observación microscópica.

Iguals consideraciones podemos hacer de la tinción de Nissl con violeta de cresilo.

Los hallazgos histológicos mostraron viabilidad del tejido implantado, en el que se observó tendencia a la maduración con diferenciación morfológica-funcional. Existiendo pérdida de la citoarquitectura, probablemente en relación a los procedimientos de manejo del tejido embrionario; aunque también se ha descrito cierto retraso en el desarrollo y maduración de células de la

corteza cerebelosa y disposición citoarquitectónica anormal en sitios profundos de tejido cerebeloso embrionario implantados a neocorteza.

Fué también notoria la vascularización periférica y dentro del implante, que de acuerdo con algunos autores procede del tejido cerebral del huésped.

En forma indirecta podemos suponer la viabilidad del tejido implantado, por ejemplo se han descrito fracasos en la implantación heterotópica a cavidades realizadas en cerebros de ratas en los que después de 6 meses de efectuado el procedimiento se encontraron vacías a excepción de algo de tejido conectivo en su interior.

Son necesarias otro tipo de preparaciones histológicas con el fin de lograr una mejor identificación celular incluyendo sus componentes ultraestructurales y sus condiciones sinápticas, así como las conexiones existentes entre el huésped y el implante y de esta manera profundizar en el conocimiento de las posibilidades de viabilidad, desarrollo, diferenciación y funcionalidad del implante. Es decir, se requieren modificaciones en las técnicas de preparación de los cerebros a estudiar, inclusiones en parafina, tinciones argénticas, estudios de degeneración anterógrada de conectividad aferente y eferente, empleo de trazadoras, observaciones de microscopía electrónica, etc.

Encontrándose actualmente en proceso algunas de estas técnicas.

Una vez estandarizado plenamente el modelo que se propone, se valorará en estudios ulteriores su aplicación a modelos experimentales de epilepsia; pudiendo usarse para tal efecto al pentilenetetrazol, toxina tetánica o al kindling, valorándose diferentes aspectos de la aplicación del implante de tejido cerebeloso embrionario en estudio y control de esta patología.

(41,43,49,51,58)

CONCLUSIONES

"No es cierto que sin la ciencia nuestro futuro sea incierto, simplemente sin ella no tenemos futuro."

Ruy Pérez Tamayo

8. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un sistema propio y original de trasplante - neural heterotópico en este laboratorio consistente en:
 - a. Colocación de una cánula guía, dirigida estereotóxicamente la sitio a implantar, la cual es dejada permanentemente en el receptor.
 - b. A través de dicha cánula se introduce un electrodo para efectuar lesión electrolítica.
 - c. Con el mismo sistema se introduce una cánula de microinyección con la que se implanta el tejido cerebeloso fetal obtenido con técnicas microquirúrgicas.
2. Se ha logrado el implante de tejido cerebeloso en los sitios elegidos, corroborándose microscópicamente su viabilidad, la continuación en el desarrollo y la diferenciación de las células cerebelosas fetales; y posiblemente la interacción del implante con el tejido cerebral receptor mediante sinaptogénesis del tejido en desarrollo con el tejido maduro.

Este tipo de método no ha sido reportado con anterioridad en la literatura en relación a trasplante neural.

Este tipo de modelo presenta las ventajas siguientes:

- a. En relación al cultivo de neuronas y al implante intraocu-

- lar, permite el estudio de interacciones entre elementos neurales embrionarios y maduros, y provee un medio más fisiológico para el crecimiento de tejido embrionario.
- b. En relación a otros métodos de trasplante intracerebral, requiere una sola intervención quirúrgica al receptor, disminuyendo el tiempo quirúrgico, y con ello morbi-mortalidad, aumentando las posibilidades de éxito en el trasplante.
 - c. El trasplante se realiza encontrándose el receptor alerta.
 - d. La implantación puede ser a sitios profundos.
 - e. El implante es colocado en un sitio preciso.
 - f. Pueden introducirse electrodos, o sistemas de tipo "push pull", para estudios específicos directamente al sitio implantado, con la posibilidad de dejarlos a permanencia.
 - g. Es factible realizar implantación de electrodos u otros instrumentos a sitios diferentes del trasplantado simultáneamente.
 - h. Esta técnica tiene la ventaja potencial de permitir disociación enzimática del tejido a implantar, puede ser contada la densidad celular en la suspensión; las células pueden ser manipuladas, mezcladas o cultivadas antes del implante.
 - i. La utilidad de este método va más allá del implante neural intracerebral, por ejemplo en este laboratorio en combinación con el servicio de Neurocirugía, se ha logrado el trasplante de médula suprarrenal a núcleo caudado y se estudia el implante de células tumorales del SNC a ratas Wistar.

Este es el primer paso que damos en el complejo campo de los trasplantes neurales, se deben realizar correcciones e incrementar el número de observaciones, pero esperamos que la experiencia de este trabajo aporte una base para quienes se encuentren interesados en esta fascinante área de las neurociencias y que en un futuro sirvan estos conocimientos para bien de la Humanidad.

BIBLIOGRAFIA

**"Conoces mis métodos. Apicalos y
será instructivo que compares los
resultados."**

A.C. Doyle

9. BIBLIOGRAFIA

1. Adams, J.H., Corsellis, J.A.N., Duchon, L. (Eds.) Greenfield's Neuropathology. Arnold, London, 1984.
2. Aguilar, R. Trasplante Neuronal, Investigación Básica y - -
Perspectivas Clínicas. Rev. Med. IMSS (Méx) 26:255-259, 1988.
3. Altman, J. Autoradiographic and histological studies of - -
postnatal neurogenesis II. Dating the time of production and
onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats
J. Comp. Neurol. 136:269-294, 1969.
4. Alvarado, R., Sotelo, C. Differentiation of Cerebellar Anlage
Heterotopically Transplanted to Adult Rat Brain: A light
and Electron Microscopic Study. The Jour. Comp. Neur.
212:247-267, 1982.
5. Anagnostopoulos, J., Knoth, R., Duffner, T., Klein, P., Volk, B.
Vascularization of Fetal Cerebellar Tissue Transplanted into
Striatum of Adult Rats. Stroke and Microcirculation.
Raven Press, New York, 1987.
6. Arendash, G., Gorski, R. Enhancement of Sexual Behavior in -
Female Rats by Neonatal Transplantation of Brain Tissue --
from Males. Science 217:1276-1278, 1982.
7. Backlund, E., Granberg, P., Hamberger, B., et al. Transplanta-
tion of Adrenal Medullary Tissue to Striatum in
Parkinsonism. J. Neurosurg. 62:169-173, 1985.
8. Benfey, M., Aguayo, A. Extensive Elongation of Axons from Rat
Brain into Peripheral Nerve Grafts. Nature 296:150-152, 1982.

9. Björklund, A., Dunnet, S., Stenevi, U., Lewis, M. Reinnervations of the Denervated Striatum by Substantia Nigra Transplants: Functional Consequences as revealed by Pharmacological and Sensorimotor Testing. *Brain Research* 199: 307-333, 1980.
10. Björklund, A., Stenevi, U., Dunnet, B., Gage, F. Cross-Species Neuralgrafting in a Rat Model of Parkinson's disease. *Nature* 298:652-654, 1982.
11. Björklund, A., Stenevi, U., Intracerebral Neural Implants: Neuronal Replacement and Reconstruction of Damage Circuitries. *Ann.Rev.Neurosci.* 7:279-308, 1984.
12. Brundin, P., Nilsson, O., Gage, F., Björklund, A. Cyclosporin A increases Survival of Cross-Species Intrastratial Grafts of Embryonic Dopamine-containing neurons. *Exp. Brain. Res.* 60:204-208, 1985.
13. Buzsaki, G., Ponomareff, G., Bayardo, F., Shaw, T., Gage, F. Suppression and Induction of Epileptic Activity by Neuronal Grafts. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:9327-9330, 1988.
14. Cooper, J.R. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology.* New York, Oxford, 1982.
15. Cooper, I., Amin, I., Riklan, M., Waltz, J. Chronic Cerebellar Stimulation in Epilepsy. *Arch. Neurol.* 33:559-638, 1976.
16. Cooper, I., Upton, A. Use of Chronic Cerebellar Stimulation for Disorders of Dishinhibition. *The Lancet* 18:595-599, 1978
17. Das, G. Differentiation of Dendrites in the Transplanted - Neurblasts in the Mammalian Brain. *Adv.Neurol.* 12:181-199, 1975.

18. Das, G., Extraparenchymal Neural Transplants: Their cytology and surviability. *Brain Res.* 241:182-186, 1982.
19. Das, G., Hallas, B. Transplantation of Brain Tissue in the Brain of Rat I. Growth Characteristics of Neocortical transplants from Embryos of different Ages. *Am. J. Anat* 158: 135-145, 1980.
20. Drucker, R., Aguilar, R., Garcia, F., Fernández, F., Bermudez, F. Fetal Suprachiasmatic Nucleus transplants: Diurnal rhythm Recovery of Lesioned Rats. *Brain Res.* 311:353-357, 1984.
21. Dunnet, S., Björklund, A., Stenevi, U. Grafts of Embryonic Substantia Nigra Reinnervating the Ventrolateral Striatum Ameliorate Sensorimotor Impairments and Akinesia in Rats with 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Research* 229:209-217, 1981.
22. Freed, W., Ko, G. Normalization of Spiroperidol Binding in the Denervated Rat Striatum by Homologous Grafts of Substantia Nigra. *Science* 20:937-939, 1983.
23. Freed, W., Medinaceli, L., Wyatt, R. Promoting Functional -- Plasticity in the Damaged Nervous System. *Science* 227:1544-1552, 1985.
24. Freed, W., Karoum, F., Spoor, E., Morishita, J. Catecholamine -- Content of Intracerebral Adrenal Medulla Grafts. *Brain Res* 269:184-189, 1983.
25. Freed, W., Perlow, M., Karoum, F., Seiger, A., Olson, L. Restoration of Dopaminergic Function by Grafting of Fetal Rat Substantia Nigra to the Caudate Nucleus: Long-Term Behavioral, Biochemical and Histochemical Studies. *Ann Neurol.* 8:510-519, 1980.

26. Gage, F., Björklund, A., Stenevi, U. Intrahippocampal Septal Grafts Ameliorate Learning Impairment in Aged Rats. *Science* 225:533-536, 1984.
27. Gibson, M., Krieger, D., Charlton, H. Mating and Pregnancy can occur in Genetically Hypogonadal Mice with Preoptic - Area Brain Grafts. *Science* 225:949-951, 1984.
28. Gilman, S., Dauth, W., Tennyson, V., Kremzner, L. Chronic Cerebellar Stimulation in the Monkey. *Arch. Neurol.* 32:474-476, 1975.
29. Haines, D. Zones in the Cerebellar Cortex. Their organization and potential relevance to cerebellar stimulation.
30. Hallas, B., Das, G. Transplantation of Brain Tissue in the Brain of the rat II. Growth Characteristics of neocortical Transplants in hosts of Different Ages. *Am J Anat* 158:147-160, 1980.
31. Hallas, B., Oblinger, M., Das, O. Heterotopic neural transplants in the cerebellum of the Rat: their afferents. *Brain Research* 196:242-246, 1980.
32. Hammond, E., Wilder, B. Gamma-Vinyl GABA: A new antiepileptic Drug. *Clin. Neuropharmacol.* 8:1-12, 1985.
33. Harvey, A., Lund, R. Transplantation of Tectal Tissue in Rats II. Distribution of Host Neurons Which Project to Transplant. *The Journ of Comp Neurol* 202:505-520, 1981.
34. Hendelman, W., Aggerwal, A. The Purkinje Neuron. I. A Golgi on its Development in the Mouse and in Culture. *J. Comp. Neurol.* 193:1063-1080, 1980.

35. Hoffer, B., Seiger, A. Electrophysiological and cytological Studies of the Brain in the Anterior Chamber of the Eye: Maturation of Cerebellar Cortex in oculo. *Brain Research* 79:165-184, 1974.
36. Ito, M. *The Cerebellum and Neural Control*. Raven Press, New York, 1984.
37. Jaeger, C., Lund, R. Transplantation of Embryonic Occipital Cortex to the Brain of Newborn Rats. An autoradiographic Study of Transplant Histogenesis. *Exp. Brain Res.* 165: 338-342, 1980.
38. Jaeger, C., Lund, R. Efferent fibers from transplanted cerebellar Cortex of Rats. *Brain Research* 105:338-342, 1979.
39. Jaeger, C., Lund, R., Transplantation of Embryonic Occipital Cortex to the tectal region of Newborn Rats: A light Microscopic Study of Organization and Connectivity of the Transplants. *The Journ. of Comp. Neurol.* 194:571-597, 1980.
40. Jonnum, J. Pharmacology of GABA neurons. In: H.Y. Meltzer (Ed.) *Psychopharmacology. The Third Generation of Progress*. Raven Press, New York, 1987, pp. 173-182.
41. Joy, R., Albertson, T., Stark, L. An Analysis of the Actions of Progabide, a Specific GABA Receptor Agonist, on Kindling and Kindled Seizures. *Exp. Neurol.* 83:144-155, 1984.
42. Kolata, G. Grafts Correct Brain Damage. *Science* 217:342-344, 1982.
43. Krall, R., Penry, J., White, B., Kupferberg, H., Swinyard, E. Antiepileptic Drug Development: II. Anticonvulsant Drug Screening. *Epilepsia* 19:409-428, 1978.

44. Kromer, L., Björklund, A., Stenevi, U. Intracerebral Embryonic Neural Implants in the Adult Rat Brain. I. Growth and Mature Organization of Brainstem, Cerebellar and Hippocampal Implants. *The Jour. of Comp. Neurol.* 218:433-459, 1983.
45. Kromer, L., Björklund, A., Stenevi, U. Intracerebral Implants A Technique for Studying Neuronal Interactions. *Science* 204:1117-1119, 1979.
46. Labre, R., Firl, A., Mufson, E., Stein, D. Fetal Brain Transplants: Reduction of Cognitive Deficits in Rats with Frontal Cortex Lesions. *Science* 221:470-472, 1983.
47. Le Gros Clark, W. Neuronal differentiation in implanted foetal cortical tissue. *J. Neurol. Psyq.* 3:263-272, 1940.
48. Levi, R. The Nerve Growth Factor 35 Years Later. *Science* 237:1154-1161, 1987.
49. Löscher, W., Schwark, W. Evaluation of Different GABA receptor Agonists in the Kindled Amygdala Seizure Model in Rats. *Experim. Neurol.* 99:454-460, 1985.
50. Löscher, W., Czuczwar, S., Jäckel, R., Schwartz, M. Effect of Microinjections of γ -Vinyl GABA or Isoniazid into Substantia Nigra on the Development of Amygdala Kindling in Rats. *Exper. Neurol.* 95:622-638, 1987.
51. Löscher, W., Schwark, W. Evidence for Impaired GABAergic activity in the Substantia Nigra of Amygdaloid Kindled Rats. *Brain Research* 339:146-150, 1985.
52. Lund, R., Hauschka, S. Transplanted Neural Tissue Develops Connections with Host Rat Brain. *Science*:193:582-584, 1976.
53. Lund, R., Harvey, A. Transplantation of Tectal Tissue in

- Rats. I. Organization of Transplants and Pattern of Distribution of Host Afferents within them. The Journ. of Comp. Neurol. 201:191-209, 1981.
54. Madrazo, I., Drucker, R., Diaz, V., Martinez, J., Torres, C. Open Microsurgical Autograft of Adrenal Medulla to the Right Caudate Nucleus in Two Patients with Intractable Parkinson disease. The New Eng Jour of Med 316:831-834, 1987.
55. Maiti, A., Snider, R. Cerebellar Control of Basal Forebrain Seizures: Amygdala and Hippocampus. Epilepsia 16:521-533, 1975.
56. Matzuk, M., Saper, C. Preservation of Hypothalamic Dopaminergic Neurons in Parkinson Disease. Ann Neurol. 18:522-555, 1985.
57. Maynert, E., Kaji, H. On the Relationship of Brain aminobutyric acid to Convulsions. J. Pharmacol. Exp Ther 133:114-121, 1962.
58. Mc Namara, J. Role of the Neurotransmitters in seizure mechanisms in the Kindling Model of Epilepsy. Fed. Proceed. 43:2516-2520, 1984.
59. Myong, Y. Reciprocal Transplantations between the optic Tectum and the Cerebellum in Adult Goldfish. J. Physiol. 288:211-225, 1979.
60. Oblinger, M., Das, G. Connectivity of Neural Transplants in Adult Rats: Analysis of Afferents and Efferents of Neocortical Transplants in the Cerebellar Hemisphere. Brain Res 249:31-49, 1982.

61. Oblinger, M., Hallas, B., Das, G. Neocortical Transplants in the Cerebellum of the Rat: Their afferents and efferents. Brain Research 189:228-232, 1980.
62. Olsen, R., Snowman, A., Lee, R., Lomax, P. Role of the γ -aminobutyric Acid Receptor-Ionophore Complex in Seizure Disorders. Ann Neurol. 16(Suppl):590-597, 1984.
63. Olson, L., Freedman, L., Seliger, A., Hoffer, B. Electrophysiology and Cytology of Hippocampal Formation Transplants in the Anterior Chamber of the Eye. I. Intrinsic Organization. Brain Research 119:87-106, 1977.
64. Oorschot, D., Jones, D. Non-Neuronal Cell Proliferation in Tissue Culture: Implications for Axonal Regeneration in the Central Nervous System. Brain Res. 368:49-61, 1986.
65. Palay, S., Chan-Palay, V. Cerebellar Cortex. Springer, New York, 1974.
66. Palkovitz, M., Brownstein, M. Maps and guide to Microdissection of the Rat Brain. Elsevier, New York, 1987.
67. Pellegrino, L.J. A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain. Plenum Press, New York, 1979.
68. Perlow, M., Freed, W., Barry, H., Seliger, A. Brain Grafts Reduce Motor Abnormalities Produced by Destruction of Nigrostriatal Dopamine System. Science 204:643-647, 1979.
69. Racine, R. Kindling: The First Decade. Neurosurg. 3:234-252, 1978.
70. Roberts, E. GABA-Related Phenomena, Models of Nervous System Function and Seizures. Ann Neurol 16(Sup):577-589, 1984.
71. Robertson, L., Dow, R., Cooper, I. Morphological Changes ---

- Associated with Chronic Cerebellar Stimulation in the humans. *J. Neurol.* 51:510-520,1979.
72. Rodwan,R., Wood,J., Van Buren,J. Significance of Purkinje Cell Density in Seizure Suppression by Chronic Cerebellar Stimulation. *Neurology* 26:645-650,1976.
73. Rosenstein,J., Brightman,M. Intact Cerebral Ventricle as a site for Tissue Transplantation. *Nature* 276:83-85,1978.
74. Schmidt,R., Björklund,A., Stenevi,U. Intracerebral Grafting of Dissociated CNS tissue suspensions: A New Approach for Neuronal Transplantation to Deep Brain Sites. *Brain Research* 248:347-356,1984.
75. Sell,F. Neuronal Groups and Fiber Patterns in Cerebellar Tissue Cultures. *Brain Res.* 42:33-51,1972.
76. Siegel,G. Basic Neurochemistry. Raven Press, New York, 1988.
77. Seliger, A., Olson,L. Quantitation of Fiber Growth in Transplanted Central Monoamine Neurons. *Cell Tissue Res.* 179:285-316,1977.
78. Simmons,R. Transplantation. En: Schwartz,S.(Ed.). Principles of Surgery. Mc Graw-Hill, New York, 1983 pp.367-434.
79. Stanfield,B., O'Leary,D. Fetal Occipital Cortical Neurons Transplanted to the Rostral Cortex can Extend and Maintain a Pyramidal Tract Axon. *Nature* 313:435-437,1984.
80. Stenevi,U., Björklund,A., Kromer,L. Differentiation of embryonic hypothalamic Transplants Cultured on the Choroidal Pia in Brains of Adult Rats. *Cell Tissue Res.* 205:217-228,1980.

81. Stonevi, U., Björklund, A., Svendgaard, N. Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the Adult Rat Brain: Techniques and Conditions for Survival. *Brain Res.* 114:1-20, 1976.
82. Stickel, D., Seiger, H. Transplante. En: Sabiston, D. (Ed.) -- *Tratado de Patología Quirúrgica.* Saunders, México, 1980 pp. 425-430.
83. Svendgaard, N., Björklund, A., Hårdobo, J., Stonevi, U. Axonal Degeneration associated with a defective Blood-Brain Barrier in Cerebral Implants. *Nature* 255:334-336, 1975.
84. Swinyard, E. Laboratory Evaluation of Antiepileptic Drugs. *Epilepsia* 10:107-119, 1969.
85. Tapia, R. El GABA. En: H. Pasantes, H. Aréchiga (Eds.). *Aminoácidos y péptidos en la Integración de Funciones Nerviosas.* UNAM, México, 1983, pp. 57-70.
86. Tennyson, V., Kremzner, L., Dauth, G. Chronic Cerebellar stimulation in the Monkey. *Neurology* 25:650-654, 1975.
87. Tulipan, N., Huang, S., Allen, G. Pituitary Transplantation: Cyclosporine Enables Transplantation Across a Minor Histocompatibility Barrier. *Neurosurgery* 18:316-320, 1986.
88. Voogd, S., Gerrits, N.M., Marani, E. Cerebellum. En: *The Rat Nervous System.* Academic Press, Australia, 1985, pp. 251-291.
89. Wada, J., Mitsumoto, S. Generalized Convulsive Seizures induced by Electrical Stimulation of the Amygdala in Cats. *Neurology* 24:565-574, 1974.
90. Wells, J., Mc Allister, J. The Development of Cerebellar Primordia Transplanted to the Neocortex of the Rat. *Develop Brain Research* 4:167-179, 1982.

91. Wolf, M. Anatomy of Cultured Mouse Cerebellum. II. Organotypic Migration of Granule Cells Demonstrated by Silver Impregnation of Normal and Mutant Cultures. *J. Comp. Neurol.* 140:281-298, 1970.
92. Wood, J., Zeigler, M., Lake, R. Elevations in Cerebrospinal Fluid Norepinephrine during Unilateral and Bilateral Cerebellar Stimulation in Man. *Neurosurgery* 1:260-264, 1977.
93. Woodward, D., Seiger, A. Intrinsic and Extrinsic Determinants of Dendritic Development as Revealed by Golgi --- Studies of Cerebellar and Hippocampal Transplants-in - - Oculo. *Exp. Neurol.* 57:984-998, 1977.
94. Woodward, W., Seil, F., Hammerstad, J. Cerebellum Plus Locus Coeruleus in Tissue Culture. II: Development and Metabolism of Catecholamines. *J. Neurosc. Res.* 17:184-188, 1987.
95. Yoon, M. Reciprocal Transplantations between the Optic Tectum and the Cerebellum in Adult Goldfish. *J. Physiol.* 288: 211-225, 1979.
96. Zager, E., Black, P. Neural Transplantation. *Surg. Neurol.* 29:350-366, 1988.
97. Zuccarello, M., Sawaya, R., Lukin, R. Spontaneous Cerebellar Hematoma Associated with Chronic Cerebellar Stimulation. - *J. Neurosurg.* 65:860-862, 1986.

NOTA

Para la presentación de esta tesis, se elaboraron fotografías y un video en formato VHS, material que puede ser solicitado al Dr. Raúl Alvarado en el Laboratorio de Formación Reticular, UIC-INNN.