

29
28

00361

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**VALORACIÓN TISULAR Y CELULAR DE LA GLÍA EN
TRANSPLANTES HOMOTÓPICOS DE 15 DÍAS DE CORTEZA
INSULAR CON Y SIN FACTOR DE CRECIMIENTO
NEURONAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

PATRICIA RIVAS MANZANO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
Transplantes	1
GLÍA	4
Neuroglía	4
Linaje glial	5
Interacciones neuronales-gliales durante el desarrollo	7
Mielinización y desmielinización	9
Interacción neuronal-glial durante la regeneración	10
Electrofisiología y transporte glial	12
Glía y barrera hematoencefálica	13
Receptores gliales y segundos mensajeros	14
Microglía	15
Corteza insular	20
Anatomía y función	20
Filogenia	21
Ontogenia	22
Factores de crecimiento	24
OBJETIVO	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Técnicas histológicas	30
Valoración morfométrica	31
RESULTADOS	32
Cualitativos	32
Tamaño del trasplante	32
Reacción inflamatoria y necrosis tisular	32
Vascularización y fibrosis	33
Microglía y macrófagos	34
Astrocitos	36
Oligodendrocitos	36
Mitosis	37
Neuronas y fibras nerviosas	38
Cuantitativos	38
Transplantes	38
Vascularización	38
Microglía	39
Macrófagos	40
Astrocitos	40
Oligodendrocitos	41
Neuronas	42
Mitosis	43
DISCUSIÓN	43
Transplantes	43
Microglía	44
Macrófagos	45
Astrocitos	46
Oligodendrocitos	48
Neuronas	49
Mitosis	49
Vascularización	52
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	54

Resumen.

Con base en los antecedentes de que el Sistema Nervioso Central (SNC) de la rata adulta posee una capacidad de regeneración tisular y celular importantes después de una lesión, y que la regeneración se realiza mejor después de introducir en la lesión tejido embrionario similar y Factor de Crecimiento Neuronal (FCN), los objetivos del presente trabajo fueron: 1. Valorar morfométrica y numéricamente las células gliales en transplantes homotópicos de corteza insular de 15 días postransplante, y 2. Analizar si la adición del Factor de Crecimiento Neuronal en el tejido transplantado tiene algún efecto tanto en la morfología como en el número de las células gliales.

El estudio se efectuó en 16 ratas lesionadas bilateralmente en la corteza insular. Después de la recuperación postoperatoria, las ratas se dividieron en cuatro lotes de cuatro animales cada uno. Un grupo no recibió tratamiento y funcionó como testigo; otro recibió transplante homotópico bilateral de corteza insular fetal (TRANS), otro el tejido fetal + FCN diluido en medio de cultivo Dulbecco-Eagle modificado (DMEM) y el último el transplante + DMEM. A los 15 días postransplante los animales se sacrificaron para el análisis histológico con la aplicación de las técnicas argentícas de Del Río-Hortega para astrocitos, oligodendrocitos, microglía, macrófagos, fibras reticulares, fibras nerviosas y doble impregnación. El análisis morfométrico de los transplantes, de los tipos celulares y de los vasos sanguíneos así como su cuantificación, se efectuó mediante un sistema de procesamiento digital de imágenes (BIOCOM) y el programa Histo 2000 en seis cortes rostrales a nivel de la corteza insular, de cada condición experimental y testigo, impregnados con cada una de las técnicas argentícas mencionadas. Los resultados se analizaron con las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey.

En todos los lotes se encontraron diferencias significativas en la morfología, número y tamaño de las células gliales. El transplante con FCN mostró además un aumento significativo del número de las neuronas, mitosis y vasos sanguíneos.

Los resultados sugieren que el grupo tratado con Factor de Crecimiento Neuronal presenta mayor integración de los transplantes, valorados por el número, tamaño y características morfológicas de las poblaciones neuronales y gliales, así como por su vascularización y características de la interfase transplante-huésped. Además, el número y tamaño de las mitosis sugieren un efecto mitogénico del FCN en las condiciones particulares de estos transplantes

VALORACIÓN TISULAR Y CELULAR DE LA GLÍA EN TRANSPLANTES HOMOTÓPICOS DE 15 DIAS DE CORTEZA INSULAR CON Y SIN FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL

INTRODUCCIÓN

TRANSPLANTES.

En la última década, la técnica de trasplantes fetales en tejido cerebral adulto, ha sido ampliamente utilizada para estudiar la capacidad de recuperación del tejido nervioso dañado en ratas adultas (Azmitia y Bjorkland, 1987; Das, 1990). Se han empleado dos tipos de trasplantes cerebrales, los homotópicos (tejido embrionario similar al del adulto) y los heterotópicos (tejido embrionario diferente al del adulto). En el primer tipo se ha mostrado que los trasplantes fetales reestablecen las conexiones anatómicas específicas en el cerebro huésped, para recuperar una función determinada (Jaeger y Lund, 1981; Kimble, 1988; Fonseca *et al.*, 1988). En el segundo caso el reestablecimiento se efectúa de una manera limitada, (por ejemplo, el modelo más empleado es el trasplante de estructuras cerebrales de origen y diferenciación similares, como es el caso de las vías catecolaminérgicas, sustancia nigra en núcleo caudado).

Para probar la recuperación funcional, se han elaborado diferentes procedimientos como la valoración de la conducta adquirida. Un modelo ampliamente desarrollado en el estudio de los procesos de aprendizaje es el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1991a). En este modelo, ratas adultas normales adquieren aversión a un sabor mediante estímulos condicionados. Enseguida se produce la lesión de los centros nerviosos involucrados en la integración de este aprendizaje, como la parte gustativa de la

neocorteza insular o de la porción anatómica del sistema límbico identificada como la amígdala. Ambas lesiones inducen a la incapacidad de adquirir el aprendizaje a la aversión gustativa (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1987). Recientemente, se ha mostrado que los trasplantes homotópicos de tejido fetal en alguna de estas áreas lesionadas, causan la recuperación de la conducta aversiva perdida, no así los trasplantes heterotópicos, colocados en la misma corteza gustativa pero provenientes del área tectal (Escobar *et al.*, 1989). Este diseño experimental demuestra por una parte la especificidad de la respuesta neuronal a ciertas funciones cognoscitivas y por otra parte la plasticidad neuronal medida en términos de regeneración tisular y celular del tejido huésped. Así como, la capacidad de diferenciación y maduración tanto celular como del tejido embrionario dentro del tejido cerebral adulto (Fernández-Ruiz *et al.*, 1991).

Los estudios preliminares morfológicos de las zonas transplantadas, utilizando las técnicas argénticas como la modificación de Golgi rápido (Díaz *et al.*, 1981), han mostrado la presencia de diferentes estadios de desarrollo neuronal, glial y angiogénico en ambos tejidos (embrionario y del huésped), inducidos quizás por los numerosos factores tróficos presentes en ellos. Al mismo tiempo, los estudios anatómicos se han efectuado de una manera cronológica, es decir, observando los diferentes tiempos postrasplante (15, 30, 45 y 60 días). En las etapas iniciales (15-30 días postrasplante), se observan numerosos procesos angiogénicos del tejido embrionario que se adhiere al tejido del huésped. De manera simultánea ocurre la proliferación de los elementos gliales y fibras nerviosas abundantes que cruzan el límite entre el huésped y el tejido embrionario transplantado, indicado la existencia de una interrelación dinámica morfofuncional entre ambos tejidos (Fernández-Ruiz *et al.*, 1991). Al efectuar las comparaciones entre los diferentes tiempos de recuperación histológica con el periodo conductual en el que se presenta la recuperación de la conducta aversiva condicionada, se observa que

ambos procesos ocurren entre los 30 y 60 días postransplante, indicando que existe un lapso en el que se reestablecen las vías morfofuncionales y que además existe un periodo de 15 días en donde la recuperación funcional es pobre, por lo que se asume falta de maduración morfofuncional del trasplante. En este mismo modelo, la adición de Factor de Crecimiento Neuronal (FCN) en el área lesionada no produce efectos significativos en la recuperación funcional. El mejor resultado en este sentido se obtuvo con el trasplante homotópico + FCN, como lo indican las primeras evidencias morfológicas con técnica de Golgi, que muestran mayor maduración neuronal en esta condición experimental (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1991b). Sin embargo todavía no se sabe si esta recuperación persistirá por el resto de la vida del animal.

En la perspectiva histórica de los trasplantes neurales hecha por Das en 1990, se hace notar que muy poca, y en algunos casos ninguna, atención se ha dado a la caracterización histológica de los trasplantes en todas sus categorías: neurales y no neurales, sobrevivientes o necróticos. La conclusión se basa en el hecho de que en prácticamente todos los estudios no se hizo un análisis histológico adecuado, tanto de los trasplantes como de los cambios patológicos inducidos en el huésped.

Por otra parte, la gran mayoría de los análisis morfológicos y fisiológicos se fundamentan en el estudio del desarrollo, diferenciación y maduración de los elementos neuronales. Aún cuando la evidencia indica proliferación y diferenciación abundante de la glía, existe poca descripción morfológica de los elementos gliales *in situ* (Jacque *et al.*, 1986; Fernández-Ruiz *et al.*, 1991), y no se sabe como se establece el linaje glial, ni mucho menos como ocurren las transformaciones estructurales que sufre el tejido neural como consecuencia de su participación activa durante los procesos de regeneración tisular. También se sabe poco acerca de las interacciones glía-neurona y glía-vasos sanguíneos en condiciones de trasplante.

Glia

Neuroglía

El Sistema Nervioso Central (SNC) está constituido por neuronas y glía (la palabra glía fué tomada del griego y traducida como "pegamento"). La glía es por mucho la más numerosa en todas las regiones del Sistema Nervioso Central de los vertebrados. Durante el desarrollo embrionario, la glía es la primera en formarse, sin embargo, la vasta mayoría no surge sino hasta muy tarde, cerca del nacimiento o en el periodo posnatal temprano. Conforme se asciende en la escala filogenética, es mayor la preponderancia de la glía sobre las neuronas, esta relación es marcada en el SNC de roedores, primates, y máxima en humanos. Así, las funciones vitales del cerebro nunca podrán ser entendidas completamente por la vía del conocimiento aislado de las neuronas y por la creencia de que la función glial es dar soporte a las neuronas para que éstas cumplan su noble función.

Las asociaciones estrechas entre glía y neuronas y entre glía y vasos fueron reconocidas por los primeros neurohistólogos, incluidos Golgi y Cajal. Si embargo, el entendimiento de su fisiología es mucho más reciente, data de los años 60's con los trabajos pioneros de Kuffler y Nicholls (1966), quienes usaron técnicas biológicas y electrofisiológicas. En los años recientes, el advenimiento de técnicas poderosas que utilizan a los anticuerpos monoclonales, el ADN recombinante y la tecnología de "patch-clamp", ha permitido reconocer el papel fundamental de la glía en la neurogénesis, la regeneración neural y la función neuronal. Las interacciones entre neuronas y glía se establecen por dos vías: una directa, a través de difusión y señales de superficie celular y otra indirecta, por los efectos sobre el medio intersticial y la barrera hematoencefálica (Abbott y Raff, 1991).

Linaje glial

Clásicamente, desde los estudios morfológicos con el empleo de impregnaciones argénticas y microscopía electrónica, las células macrogliales en el SNC fueron divididas en oligodendrocitos y astrocitos y más tarde divididos los últimos en protoplásmicos y fibrosos, localizados en las sustancias gris y blanca respectivamente. Actualmente, con las técnicas inmunocitoquímicas se ha visto que los cultivos de astrocitos del nervio óptico de rata contienen tres tipos de células macrogliales antigénicamente distintos: oligodendrocitos y dos tipos de astrocitos, tipo 1 y tipo 2, los cuales aparecen en diferentes etapas de desarrollo y derivan de dos linajes celulares distintos y no se interconvierten (Fig. 1). Los astrocitos tipo 1 de un precursor (A2B5-, PFAG+, citotactina-) y los oligodendrocitos y los astrocitos tipo 2 de otro precursor (A2B5+, PFAG+, citotactina+) común denominado progenitor O-2A (Regan, 1988). Los astrocitos tipo 1 se encuentran principalmente en cultivos de sustancia gris y son considerados semejantes morfológica y antigénicamente a los astrocitos protoplásmicos observados *in vivo*. Funcionalmente, los astrocitos tipo 2 se consideran semejantes a los astrocitos fibrosos (astrocitos perinodales) de los tractos de fibras mielínicas (Cameron y Rakic, 1991). Mientras que el precursor O-2A en cultivo se diferencia autónomamente en oligodendrocitos, su diferenciación en astrocitos tipo 2 requiere de dos o más señales producidas por otras células, probablemente astrocitos tipo 1 y células mesenquimatosas: factor neurotrófico ciliar (FNC) y señales de la matriz extracelular (Prochiantz, *et al.* 1990; Manthorpe, *et al.* 1990). Los astrocitos tipo 1 también producen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP) y el factor de crecimiento fibroblástico (FCF); ambos estimulan la división del O-2A y su diferenciación en oligodendrocitos. En las células O-2A, la exposición simultánea a estos dos

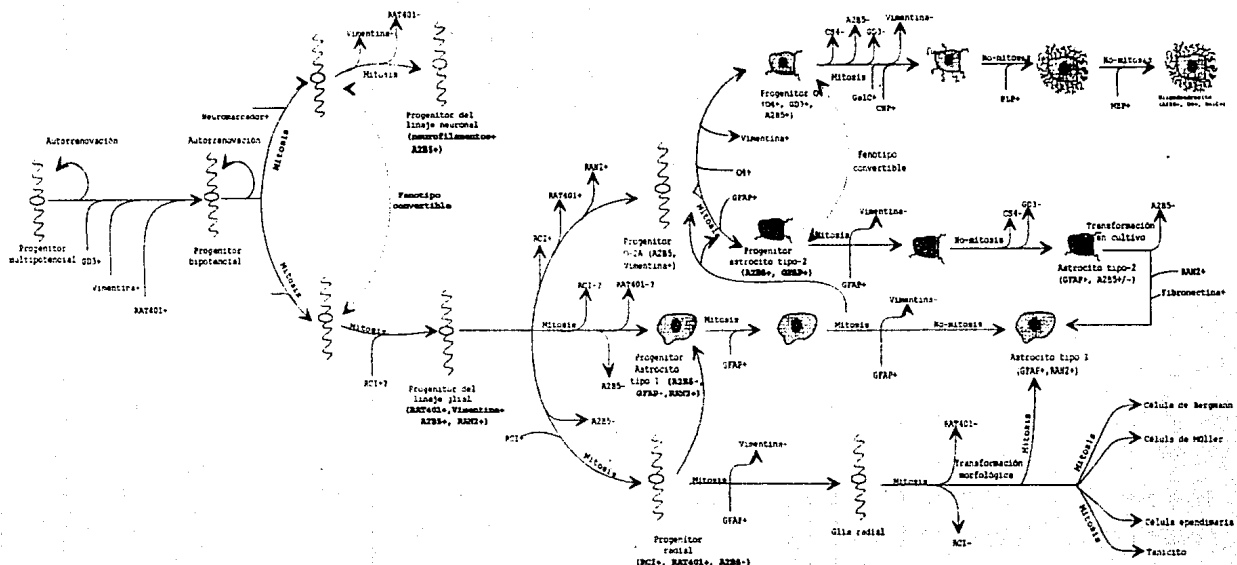


FIG. 1

Concepción moderna del posible linaje glial durante el desarrollo de la corteza cerebral. La presencia o ausencia de antígenos de identificación se indican por flechas con signos + o -. (Cameron & Rakic, 1991.)

mitógenos inducen autorrenovación y ausencia de diferenciación. Esto concede importancia relevante a la interacciones glía-glía (Choi, 1990; Levi, *et al.* 1990; Sensenbrenner, *et al.* 1990; Rumsby *et al.*, 1990; Fulton *et al.*, 1991; Noble *et al.*, 1991; Dulty y Schwab, 1991, McKinnon *et al.*, 1993).

In vitro, los astrocitos tipo 1 tienen una morfología aplanada semejante a fibroblastos, mientras que los tipo 2 la tienen estrellada. Los astrocitos tipo 1 forman la glia limitante y extienden sus procesos hacia la piamadre y los vasos sanguíneos y los astrocitos tipo 2 lo hacen hacia los nodos, formando una estrecha asociación con la membrana axonal a nivel de los nodos de Ranvier. Por otra parte, se ha sugerido que los astrocitos tipo 1 expresan canales de sodio "tipo glial", mientras que los de los astrocitos tipo 2 son de "tipo neuronal" (Minturn *et al.*, 1990).

La diferenciación de O-2A hacia oligodendrocitos depende de señales medioambientales; las células del linaje oligodendrocítico se caracterizan por la aparición del antígeno O4, la diferenciación en oligodendrocitos maduros se caracteriza por la aparición de galactocerebrósido, seguida por la expresión de proteína proteolípídica (PLP) y proteína básica para mielina (MBP) (Bansal *et al.*, 1990).

Skoff and Knapp, (1991) definen a una célula como oligodendrocito cuando expresa un marcador antigénico que es específico para la célula madura *in situ* e indican que la vasta mayoría de glia que se divide en el cerebro de roedores en etapa posnatal, expresan marcadores y tienen las características de oligodendrocitos inmaduros (Gard *et al.*, 1988). Kettenmann *et al.*, (1991) han demostrado que los precursores oligodendrogiales expresan un tipo definido de voltaje y canales iónicos que cambian con el desarrollo. Cuando el precursor bipotencial se desarrolla hacia oligodendrocito, el voltaje de Na⁺ y varios tipos de corriente de K⁺ desaparecen mientras que se hace dominante una corriente de K⁺

rectificante hacia el interior de la célula. El cambio en el repertorio de canales puede reflejar la transición de un estado plástico (precursor glial) a uno más especializado (oligodendrocito). La formación de uniones comunicantes entre células del linaje oligodendroglial tiene lugar sólo cuando estas se transforman en oligodendrocitos (Von Blankenfeld *et al.*, 1993).

Interacciones neuronales-gliales durante el desarrollo

Se sabe actualmente que la glía juega un papel importante en el desarrollo neuronal, influenciando la forma neuronal, la emigración de neuroblastos y de los conos de crecimiento, la sobrevivencia y la diferenciación neuronal. Se ha sugerido que el contacto entre neuronas y glía en el SNC del embrión en desarrollo controla el número de varias clases de células nerviosas y determina sus proporciones correctas. Además, tales contactos pueden regular el despliegue apropiado de células gliales las cuales, de manera subsecuente, pueden participar en la compartimentalización y al mismo tiempo servir como guía para la emigración neuronal. Tales contactos han sido también implicados en la adquisición de fenotipos neuronales específicos, guía de los conos de crecimiento y involucramiento de las somas y prolongaciones neuronales. Se piensa que las células gliales también son intermediarios metabólicos esenciales entre las células endoteliales de los capilares y las neuronas. Los procesos de las células gliales también están implicados como elementos intermediarios en el rearrreglo y eliminación de las uniones sinápticas. Finalmente, se ha reconocido que las membranas gliales están involucradas activamente en el intercambio de nutrientes, neurotransmisores, segundos mensajeros, iones y varios factores de crecimiento, todos los cuales juegan un papel preponderante en el desarrollo normal del cerebro (Rakic, P. 1991).

Las interacciones neuronales y gliales durante la regeneración y el desarrollo provienen de eventos moleculares múltiples, dado que las células gliales producen moléculas de reconocimiento que promueven el crecimiento de los axones, la expresión de las cuales se correlaciona con su potencial para promover la regeneración en los sistemas nervioso central y periférico de los mamíferos adultos. La glía reconoce también moléculas de unidades o de grupos de neuronas durante el establecimiento de los mapas topográficos y despliega la función dual de ser adhesiva y antiadhesiva. Las funciones de barrera de las moléculas gliales antiadhesivas pueden contribuir a la inhabilitación de las neuronas para regenerarse en el SNC de mamíferos adultos. Las moléculas de reconocimiento glial pueden influenciar el medio iónico intra y extracelular durante el desarrollo (Schachner, 1991).

Los estudios neuroanatómicos han mostrado que las fibras astrogliales proveen el sustrato primario para la emigración neuronal. Estudios *in vivo* proveen evidencias de que las neuronas emigrantes expresan características citológicas distinguibles, que incluyen la formación de uniones especializadas en sitios de contacto y la extensión de un proceso principal activo en dirección de la emigración. *In vitro*, la astrotactina (expresada por las neuronas) juega un papel crítico en la unión neurona-glía durante los periodos de la emigración neuronal guiada por la glía (Stitt *et al.*, 1991).

Durante el desarrollo del cerebro, la glía y los glucoconjugados que la rodean (glucoproteínas, glucolípidos, glucosaminoglucanos) forman unidades funcionales que consisten de agregados densos de glía radial PFAG+, astrocitos jóvenes y sus procesos y glucoconjugados regulados (que pueden ser moléculas de reconocimiento de las membranas o estar contenidas en la matriz extracelular). Lesiones en el desarrollo del cerebro y la astrogliosis revelan la reexpresión de algunas macromoléculas presentes durante la formación de áreas en el desarrollo

(Laywell y Steindler, 1991).

Mielinización y desmielinización

En el SNC un oligodendrocito mantiene muchos internodos, algunos de diferentes axones, por lo que la demanda metabólica de estas células durante el desarrollo es enorme. Durante el proceso de mielinización el oligodendrocito presenta un nucleolo prominente, una gran concentración de ribosomas y complejo de Golgi, lo que se correlaciona temporalmente con el incremento de síntesis de proteínas y lípidos para formar la mielina. Por el contrario en el SNC adulto el citoplasma del oligodendrocito posee menos retículo endoplásmico y se caracteriza por una demanda metabólica reducida (Davidson, 1991).

El programa por el cual los precursores de los oligodendrocitos se diferencian en células formadoras de mielina es el resultado de la interacción entre la expresión de genes intrínsecos y señales ambientales. La maduración de los oligodendrocitos parece estar determinada por la activación y represión secuencial y transcripcional de genes específicos por medio de la unión de proteínas al ADN (Brophy, 1991). Durante la diferenciación neural, los oligodendrocitos aparecen primero en la zona subventricular (ZSV) como células redondeadas, más largas que anchas y positivas al gangliosido GD3. Estas células no tienen las características ultraestructurales de los oligodendrocitos o los astrocitos maduros; sin embargo, al abandonar la ZSV forman procesos cortos y escasos, los cuales se van haciendo cada vez más complejos y largos, hasta adquirir la morfología adulta (Goldman y Vaysse, 1990).

El proceso de desmielinización inflamatoria en el SNC ha sido revisada por Compston y Scolding (1991), quienes sugieren la siguiente secuencia de eventos durante este proceso: Primero los linfocitos T activados y macrófagos expresan

moléculas de adhesión superficial que siguen el curso de las células endoteliales. El aumento en la permeabilidad permite que varios mediadores solubles se concentren en la superficie abluminal de los capilares cerebrales, produciéndose un edema local intenso; el número de oligodendrocitos se reduce, las células que sobreviven se muestran anormales y la mielina es removida por macrófagos. Las células fagocíticas infiltradas desarrollan placas que contienen restos de mielina asociados con anticuerpos y complemento; la lesión subaguda es ahora reconstituída por oligodendrocitos o sus progenitores y hay una extensa remielinización; sin embargo en las lesiones crónicas se ha observado una marcada reducción oligodendrocítica así como desmielinización.

Ludwin (1990) por su parte indica que después de la degeneración Walleriana, los oligodendrocitos del cerebro adulto pueden sobrevivir en ausencia de axones, pero no se sabe si su estado de diferenciación permanece igual. Pocos oligodendrocitos pueden incorporar timidina tritiada, ya que la mayor respuesta proliferativa se observa en microglía y astrocitos.

Interacción neuronal-glial durante la regeneración

Si el SNP es dañado puede ocurrir cierto recrecimiento y reconexión. Las preguntas importantes en este campo son 1) ¿por qué esto mismo no sucede en el SNC? y 2) ¿pueden ser atribuidas algunas de estas diferencias a las propiedades gliales? Hay evidencia suficiente de que las células de Schwann del SNP juegan un papel crucial en el mantenimiento del crecimiento axonal después del daño, pero en la glía del SNC parece no ocurrir así, porque las proteínas que previenen el crecimiento axonal están asociadas con la mielina producida por los oligodendrocitos (Schwab *et al.*, 1990). Además la proteína glial unida a hialuronato (GHAP) es un factor inhibitorio para el crecimiento axonal. La GHAP

es una glucoproteína que se localiza principalmente en la sustancia blanca y aparece tarde en el desarrollo. Se ha sugerido que la GHAP es producida por una población glial PFAG- que es diferente de la población de astrocitos tipo 2 con morfología estrellada (Bignami *et al.*, 1990). Se ha reportado también que los astrocitos adicionados a cultivos de neuronas hiperinervadas, inducen disminución dramática del número de contactos sinápticos previamente establecidos (Meshul *et al.*, 1987).

Por otra parte, es posible que los astrocitos constituyan una protección neuronal después de varios tipos de insultos. Vibulsreth *et al.* en 1987 demostraron mayor sobrevivencia de neuronas cultivadas con astrocitos, en comparación con cultivos neuronales puros después de un insulto anóxico. También es evidente que la proliferación o alteración de los astrocitos (acúmulo de PFAG, aumento de tamaño o número de procesos) es una reacción cerebral en respuesta a una variedad de insultos (Costero, 1946; Sher y Hu, 1990).

Si se acepta que la glía juega entre otros, un papel en el desarrollo y en la reconstrucción del cerebro adulto dañado, no es exagerado aceptar la posibilidad de que la glía pueda guiar la plasticidad neuronal en la vida adulta en el proceso continuo de aprendizaje, adaptación y memoria. Si como se ha sugerido la glía tiene un papel en las propiedades plásticas del SN, no es coincidencia la primera demostración hecha por Müller y Best en 1988, de que la corteza visual del gato adulto puede ser restaurada plásticamente por el trasplante de glía neonatal (astrocitos cultivados) (Raisman, 1991).

Trasplantes de nervio periférico en sitios del SNC adulto (colículo superior) cambian el medio no neuronal y permiten el crecimiento de los axones centrales adultos, los cuales penetran en sus blancos y reforman las sinapsis normales para excitar o inhibir a las neuronas postsinápticas (Bray *et al.*, 1991; Bunge, 1991).

Electrofisiología y transporte glial

Se ha sugerido una función dinámica para la neuroglía en el control del microambiente neuronal (Attwell *et al.*, 1991), para la cual existe una señalización entre neuronas y glía (Barres *et al.*, 1988; Salm *et al.*, 1990. Barres, 1991 y Van der Zee *et al.*, 1993).

En resumen, Ritchie (1991) ha puntualizado que: 1) los astrocitos expresan canales de voltaje, 2) estos canales expresan un espectro de corrientes, 3) las diferentes corrientes fluyen en clases separadas de canales (Na, K, Cl, etc), 4) un astrocito dado puede expresar corrientes con diferentes características electrofisiológicas *in vivo* o *in vitro*, 5) las características de corriente expresadas por un astrocito pueden cambiar con el tiempo de cultivo y 6) el patrón de corriente expresado por un astrocito depende de los contactos neuronales.

La actividad eléctrica de algunas neuronas libera iones K^+ en el espacio extracelular, este aumento en la concentración del K^+ puede causar severas alteraciones en la excitabilidad neuronal (Reichenbach, 1991), lo cual apoya las evidencias de que las neuronas pueden controlar la expresión de los canales gliales. El hinchamiento temporal de la glía en respuesta a las altas concentraciones de K^+ es resultado de su función homeostática para el mantenimiento de una concentración extracelular constante de potasio (Walz y Mujerji, 1988).

Canady *et al.*, en 1990 han sugerido que la liberación de K^+ en el espacio extracelular pueda regular la expresión de PFAG y la morfología de los procesos astrocíticos. Las neuronas activas mantienen la expresión normal de PFAG y facilitan la plasticidad morfológica de las prolongaciones astrocíticas. En las neuronas inactivas o muertas falla la liberación de K^+ y sobreviene un aumento de la expresión de la PFAG y posiblemente aumento en la rigidez y extensión de los

procesos astrogliales.

La transferencia de iones y moléculas pequeñas entre axones y glía ha sido reportado en vertebrados e invertebrados, sin embargo poco se sabe del papel funcional de las grandes moléculas que intercambian axones y glía. Reportes recientes sugieren que algunas de estas grandes moléculas son "proteínas de estrés", que se sintetizan en la glía y son transferidas a los axones y que pueden asistir directa o indirectamente a las neuronas para tolerar el estrés ambiental como el shock térmico, exposición a tóxicos químicos, privación de oxígeno y glucosa y lesiones traumáticas.

Glía y Barrera hematoencefálica

Todos los vertebrados y algunos invertebrados poseen una barrera hematoencefálica, pero la barrera de los invertebrados está formada por la glía, la cual tiene varios tipos de unión en sus bordes (comunicantes y ocluyentes), mecanismos ion y voltaje-dependientes y baja permeabilidad paracelular; las propiedades de liga de cationes de la matriz extracelular coadyuva al mecanismo de barrera. En todos los vertebrados excepto los elasmobranquios, la barrera es endotelial, está formada por uniones intercelulares estrechas entre las células endoteliales y sirve para aislar al cerebro de los cambios de composición de los fluidos circulantes. La barrera hematoencefálica proporciona un microambiente extracelular basal cuyos cambios pueden ser controlados por las células gliales, ya que este microambiente no es constante y cambia durante la actividad neuronal y sináptica, hay cambios en la concentración de K^+ , Ca^{++} , pH, liberación de agentes neuroactivos y factores que afectan la excitabilidad neuronal (Brightman, 1991).

Las interacciones entre astrocitos y células endoteliales han sido demostradas *in vivo* en transplantes de tejido cerebelar y en cocultivos endoteliales-astrogliales

in vitro. Los microvasos sin barrera, originados desde el iris del ojo, se hacen capilares de barrera cuando ellos penetran en el interior de un tejido neural y se cubren de procesos astrogliales. En cultivo, la presencia de la astrogliá restaura las propiedades de las uniones estrechas de la barrera con la formación de encallamientos amplios, ininterrumpidos y complejos. Otro efecto de la astrogliá sobre las uniones celulares es una marcada reducción en las uniones comunicantes, probablemente afectadas por factores secretados por los astrocitos (Brightman y Tao-Cheng, 1990; Nagy y Martínez, 1991), posteriormente a la inducción de los complejos de unión, surge sobre las membranas endoteliales la expresión de enzimas y transportadores regulada por los requerimientos fisiológicos del compartimiento neuronal (Risau, 1991).

Receptores gliales, señales y segundos mensajeros

Uno de los caminos probables a través de los cuales interactúan las neuronas y la gliá durante el desarrollo, la función neural adulta y los estados patológicos, es quizás la comunicación desde las neuronas hacia la gliá vía el K⁺, pero la comunicación a través de los neurotransmisores es potencialmente más específica y precisa. Los trabajos de esta década han mostrado que con muy pocas excepciones la neurogliá posee los mismos tipos de receptores acoplados a las mismas vías de señalamiento intracelular y canales iónicos presentes en las neuronas (Hansson, 1990; Pearce, 1991, Van der Zee *et al.*, 1993).

Los receptores para glutamato de los astrocitos son muy similares a los receptores de glutamato presentes en las neuronas centrales, teniendo además de las similitudes biofísicas, algunas farmacológicas (Gallo *et al.*, 1990). Evidencias indirectas sugieren que los astrocitos tipo 2 son las células que extienden sus pies terminales a los nodos de Ranvier *in vivo* y que este tipo de astrocitos es el que

expresa receptores a glutamato, lo cual sugiere que la activación de tales receptores pudiera alterar las concentraciones de potasio y sodio locales al nodo de Ranvier o alterar la excitabilidad del axón. Los astrocitos tipo 2 tienen canales sensibles a voltaje activados por calcio y sodio (Fatatis y Brennehan, 1990; Cull-Candy y Wyllie, 1991).

Los receptores peptídicos gliales (como receptores: VIP, adrenérgicos, serotoninérgicos, opioides, aminoácidos y sustancia P) muestran diferencias regionales interesantes dentro del SNC y la unión al sistema de segundos mensajeros intracelulares (Hansson, 1990; Höslí *et al.*, 1990; Wilkin *et al.*, 1990, 1991). La glía a su vez puede liberar agentes neuroactivos incluyendo taurina que puede actuar como un neuromodulador inhibitorio y modular los niveles de Ca^{++} que pueden ser importantes en la sinapsis, pero también puede actuar en la regulación del volumen tanto de las células gliales como neuronales (Dutton y Philibert, 1990; Kimelberg *et al.*, 1990).

Microglía

La diminuta célula de microglía del SNC representa un elemento no neuronal y no astrocítico que ha sido motivo de controversia, ambigüedad semántica, caracterización evasiva y ontogenia indefinible. Su movilidad, polimorfismo, sensibilidad microambiental capaz de transformar su expresión fenotípica, desafía el uso de términos convencionales para describirla (Theele and Streit, 1993).

Desde los trabajos pioneros de Del Río-Hortega (1919, 1921 y 1932) y Costero (1929, 1930, 1931), se describe la morfología y función de las células de microglía y se postula que: 1) son elementos de origen mesodérmico, que proceden de la Píamadre, en especial de la tela coroidea superior e inferior, 2) al penetrar al tejido nervioso sufren cambios en su morfología como: redondeada, tuberosa,

seudopódica y ramificada, 3) la variabilidad en la forma es debida a movimientos de gesticulación, translación y acomodación a los intersticios nerviosos y al estado de reposo, 4) son macrófagos genuinos que intervienen activamente en procesos patológicos y 5) Durante los procesos patológicos recuperan paulatinamente las formas pseudopódica, tuberosa y redondeada, lo cual es favorecido por el reblandecimiento local de la trama nerviosa.

In vitro, si se recambia el medio de cultivo, se presentan solamente escasas células microgliales, pero cuando se mantiene muchos días sin cambiar el medio, las células de microglía se multiplican rápidamente. Cuando al medio de cultivo se le añade carmín laca, tinta china u otro colorante de los empleados para bloquear el sistema fagocítico mononuclear, la microglía emigrante lo fagocita y transporta hasta los límites del medio, el cual queda en pocas horas limpio de cuerpos extraños. La microglía presenta en los cultivos, casi exclusivamente formas pseudopódicas y amiboides (Costero, 1929, 1930, 1931).

Muchas de las conclusiones de Del Río-Hortega y Costero, respecto a su transición metamórfica, fisiología, propiedades patofisiológicas, origen embriológico y distribución histogenética se ha corroborado con los métodos más recientes y sofisticados. Con el advenimiento de la inmunohistoquímica se espera que el linaje microglial pueda ser establecido en los próximos años con base en la expresión común de antígenos (Theele and Streit, 1993).

Se ha reportado que macrófagos de origen hemático entran al tejido cerebral dañado; sin embargo, en el cerebro maduro normal solamente se ha encontrado microglía ramificada, células morfológicamente diferentes a los macrófagos. Al utilizar marcadores específicos (DiI-ac-LDL) las células con prolongaciones cercanas a las lesiones son idénticas a la microglía ramificada encontrada en el cerebro en desarrollo. Parece que las células ramificadas de la lesión representan una población celular intrínseca del cerebro. Estas células ramificadas DiI-ac-

LDL+ aparecen unas horas después de la lesión y decrecen en número, de tal forma que dos días después del daño la mayoría de las células marcadas fueron células de forma redondeada. A este tiempo la carencia de células con procesos puede representar la conversión de microglía ramificada hacia formas amiboides como sugirió Del Río-Hortega (Giulian, 1990). Con anticuerpos monoclonales Perry *et al.*, en 1985 han mostrado que células que expresan receptor Fc y receptores de complemento, son indistinguibles por su morfología de la microglía parenquimática. Por otra parte estudios histoquímicos han demostrado la presencia abundante de esterasa-no-específica (+) en la microglía amiboide en el cerebro de ratas recién nacidas (Giulian, 1990).

Si bien los macrófagos activados son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y entrar al SNC, el cerebro tiene su propia población residente de células fagocíticas o microglía, células de linaje macrofágico que pueden haber derivado de macrófagos infiltrados durante la vida perinatal. La microglía amiboide y redondeada se reconoce en el cerebelo fetal de ratón en el día embrionario once (E-11), marcada con una lectina conjugada-peroxidasa, el número de la microglía se incrementa constantemente después de este tiempo. La microglía amiboide se sigue reconociendo hasta P-10, después sólo se encuentra microglía ramificada (Ashwell, 1990). Utilizando técnicas de inmunohistoquímica para la detección de la glucoproteína F4/80 de membrana para macrófagos, se encontró que la microglía redondeada y pseudópoda solo se encuentra en el SNC en los sitios carentes de barrera hematoencefálica; en el resto de los territorios solamente está presente la microglía ramificada (Lawson *et al.*, 1990). Los cambios morfológicos asociados con la activación microglial se parecen a los observados en macrófagos y se sabe que son acompañados por alteraciones en la expresión de antígenos de histocompatibilidad mayor que es lo más notable de la activación inmunológica (Compston y Scolding, 1991).

Las células de microglía tienen las características de las células del linaje macrófágico (Frei, *et al.*, 1987). Además del Factor de Necrosis Tumoral (FNT), la microglía activada produce interleucina-1 (IL-1) y proteasas, mediante las cuales puede mediar el daño tisular y contribuir a la astrogliosis y por sus propiedades fagocíticas remueve los detritos celulares. La liberación de IL-3 derivada de los astrocitos induce la proliferación de las células de microglía (Frei *et al.*, 1988). Electrofisiológicamente, la carencia de corriente de salida de K⁺ de las células de microglía, las hace muy sensibles a los agentes despolarizantes Kettenmann *et al.*, 1993) y por tanto a los cambios microambientales que se suceden en condiciones normales y patológicas.

El término plasticidad funcional se ha usado para referirse a los cambios en la morfología microglial, inmunofenotipo y función que ocurre cuando estas células son confrontadas con algún cambio en su microambiente, el cual puede ser resultado del desarrollo normal o de algún insulto (Theele y Streit, 1993).

La astroglia secreta factores tróficos que transforman las células progenitoras en microglía. Uno de estos factores es el factor de crecimiento macrófágico (FCM-1). Los fibroblastos embrionarios también secretan un factor trófico que actúa sinérgica o aditivamente con el FCM-1 sobre las células microgliales progenitoras (Richardson *et al.*, 1993).

En estado sano el SNC es un sitio inmunológicamente privilegiado ya que es notablemente pobre en la expresión de productos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH); sin embargo, el SNC tiene todos los requerimientos básicos para dar una reacción inmune local por células gliales activadas (microglía y astrocitos) presentadoras de antígenos (Aloisi y Wekerle, 1990). Esto se ha observado durante las enfermedades, lesiones y transplantes, con la expresión de moléculas de superficie Clase I y Clase II del CMH (Kajiwara *et al.*, 1991). Poco tiempo después del daño, la microglía activada, quizás por señalamiento neuronal,

y los macrófagos invaden los sitios lesionados del SNC. Estas células están comprometidas en una variedad de actividades que incluyen eliminación de detritos, liberación de factores de crecimiento astrogial (interleucina-1), intermediarios de óxido nítrico reactivos (anión superóxido y NO), intermediarios de oxígeno reactivos (O₂- y H₂O₂) componentes del complemento, proteínas de unión (ferritina y fibronectina), secreción de proteasas (catepsina B y L), prostaglandinas, leucotrenos, factor de necrosis tumoral (FNT) y presentación de antígenos (Giulian *et al.*, 1988; Giulian, 1990; Banati *et al.*, 1993). El papel de las citocinas inflamatorias en la patogénesis de las enfermedades neurológicas no ha sido bien entendido. Los efectos neurotóxicos de las citocinas puede ser mediado por la inmunoestimulación de las células de microglía que producen concentraciones tóxicas de óxido nítrico (NO), óxidos de nitrógeno reactivos, anión superóxido y aminoácidos excitatorios parecidos al glutamato y quinolato, lo cual sugiere una interacción entre neuronas y microglía y un efecto citotóxico de las células de microglía (Boje y Arora, 1992; Giulian, 1993; Banati *et al.*, 1993). La interleucina-1 inhibe a los oligodendrocitos *in vitro* y el FNT también ejerce un efecto citotóxico sobre ellos, efecto que puede ser inhibido por el Factor de crecimiento transformado B1, producido también por las células de microglía. El repertorio de factores tóxicos producidos y liberados por la microglía da a estos elementos el papel clave en la iniciación y mediación del daño tisular autodestructivo secundario (Banati *et al.*, 1993), (figura 2).

La diferente respuesta inmunológica de la microglía cerebral, marcada con anticuerpos para microglía y macrófagos, valorada en diferentes modelos de trauma y enfermedad, refuerza el concepto de que la microglía es un miembro pluripotente de la familia macrófago-monocítica y que posee la capacidad para responder de diversas maneras; algunas de ellas muestran alta especificidad y plasticidad de reacción, por las diferentes moléculas que elaboran (Floris *et al.*,

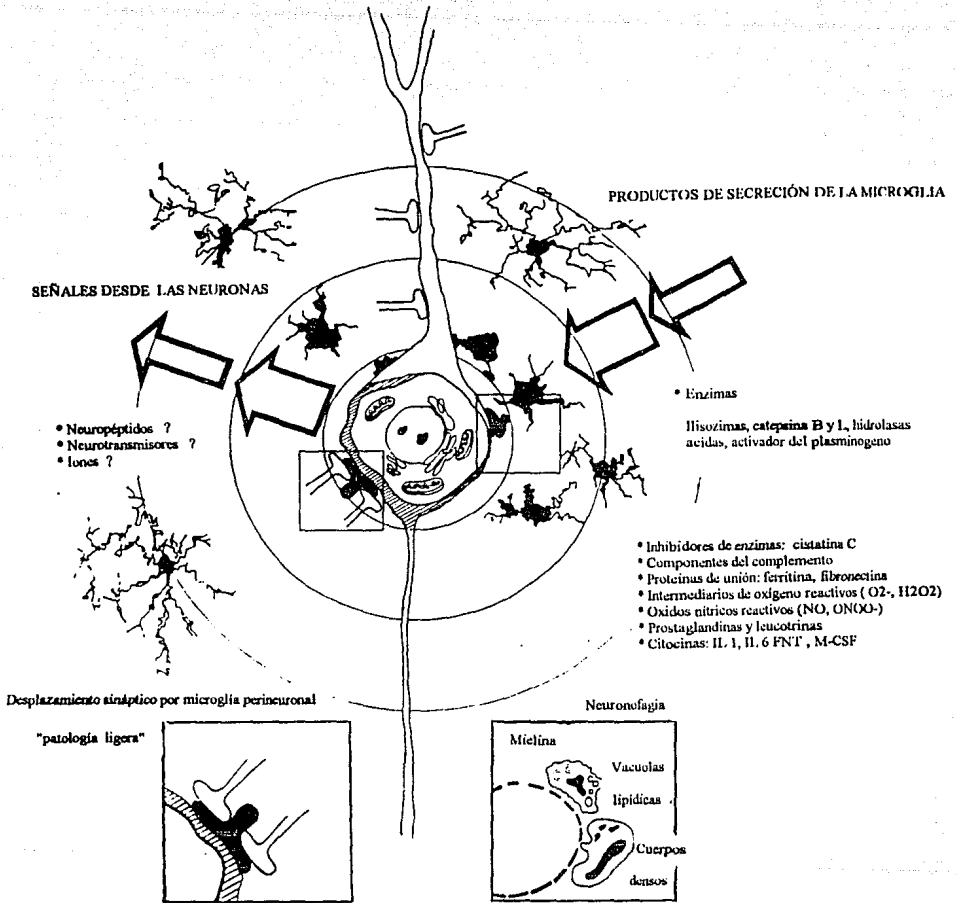


Fig 2. Interacción entre neuronas y microglia. El estrés neuronal produce un señalamiento desde las neuronas a la glia. La microglia es "un elemento de respuesta temprana" que responde al señalamiento inicial neuronal con una respuesta graduada, que incluye la liberación de productos de secreción. De acuerdo a la severidad del estrés neuronal, la microglia desplaza las sinapsis conduciendo a la deafferentación de la neurona estresada, o si se produce la muerte neuronal, remueve la neurona muerta (Banati, *et al.*, 1993).

1993).

La acción de las neurotoxinas producidas por la microglía reactiva y macrófagos durante la fase aguda de inflamación puede limitar la sobrevivencia y la función neuronal. Esta acción puede ser balanceada por factores de crecimiento liberados por los astrocitos en las fases tardías de la reparación del daño (Giulian, 1993).

CORTEZA INSULAR

Anatomía y Función

Desde 1959, Benjamin y Akert describieron la corteza insular como un área cortical crucial para la sensibilidad gustativa. Los datos morfofuncionales indican la existencia de una corteza gustativa dividida en subáreas, una de las cuales es la corteza insular (Braun *et al.*, 1982) (Figura 3).

Vía Gustativa: La información sensorial gustativa, es llevada por fibras gustativas provenientes de los nervios facial intermedio, glossofaríngeo y vago y proyectan directamente sobre el núcleo ventromedial posterior talámico, existiendo una colateral al núcleo central amigdalino para terminar en la corteza insular y a la neocorteza sensorial primaria, en donde se integran los estímulos gustativos.

Aferencias: Por diversos experimentos anatómicos de lesión, se ha mostrado que la corteza insular que rodea a la arteria cerebral medial de la rata, recibe un número considerable de proyecciones monosinápticas desde el área gustativa pontina así como axones colaterales de las proyecciones amigdalocorticales y pontocorticales que pasan por el núcleo ventromedial posterior del tálamo. Las lesiones en la corteza insular producen defectos en la adquisición del condicionamiento aversivo a los sabores, mientras que las áreas de asociación gustativas no contribuyen a la integración de esta conducta, indicando una relación funcional circunscrita a

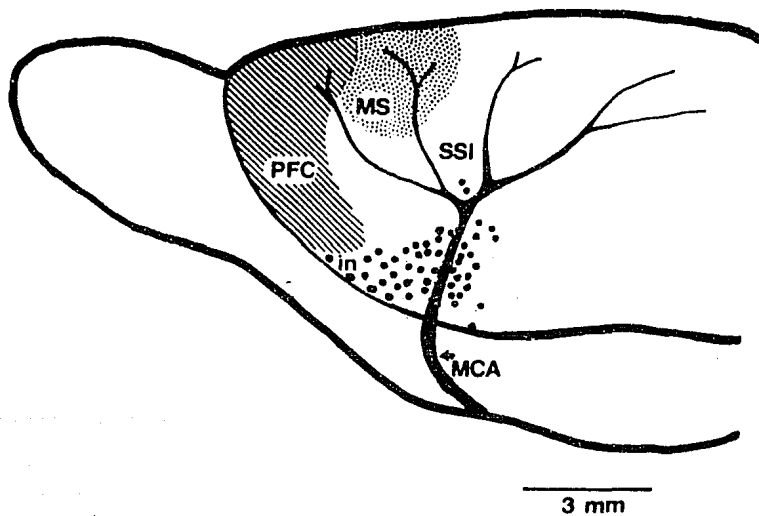


Figura 3. Región cortical gustativa, delimitada (círculos llenos) por los estudios electrofisiológicos de Yamamoto y Kawamura (1972). Las neuronas gustativas se localizan dentro de la corteza somática y corteza insular (áreas 13 y 14). Corteza insular (in), arteria cerebral medial (MCA), corteza motora (MS), corteza prefrontal (PFC), neocorteza somatosensorial primaria (SSI).

ciertas zonas de la corteza insular (Braun *et al.*, 1982)

Filogenia.

En los reptiles se reconoce por primera vez una neocorteza primordial identificada como la formación existente entre el hipocampo (arquicorteza) y la corteza piriforme (paleocorteza). No se delimita claramente entre las estructuras corticales circunvecinas, por lo que se le describe en estos animales como corteza general.

Los mamíferos presentan la mayor evolución laminar de la corteza, además de circunvoluciones neocorticales presentes en particular en las especies visuales como el hombre, los cetáceos y los felinos.

La formación de la neocorteza insular se debe en parte a que durante el desarrollo de los hemisferios cerebrales, la neocorteza empuja en sentido ventral y lateral a la corteza piriforme, formando de esta manera el surco rinal, que es una línea de demarcación entre las dos áreas corticales.

La estructura citoarquitectural en seis capas de la corteza, sugiere su posible evolución a partir de la corteza hipocampal y piriforme simultáneamente. El arquicórtex que forma la cara medial y el paleocórtex que forma la cara lateral de cada hemisferio cerebral, probablemente ambos dieron origen a una corteza laminada cuya arquitectura entre las tres y las seis capas es de complejidad intermedia. Esta corteza intermedia rodea a la primitiva corteza original y una segunda zona de neocorteza aun más diferenciada forma un anillo concéntrico adicional, que se convirtió en las estructuras parahipocampales de la superficie medial, tales como la circunvolución del cíngulo y la corteza insular de la cara lateral hemisférica. Un tercer anillo de neocorteza, todavía más diferenciado, aparece entonces formando la corteza paralímbica y parainsular cuya función es la

integración de informaciones sensitivas y motoras.

En el cerebro humano, la región insular está completamente cubierta por los márgenes de la cisura de Silvio, aunque está parcialmente cubierta en algunos otros primates. En la mayoría de los mamíferos, la región insular homóloga queda superficial en la cara lateral del hemisferio (Sarnat y Netsky 1976).

Ontogenia

El origen de la neocorteza humana comprende cinco etapas: Durante la etapa I, se forma la placa cortical (7-10 somitas) cuyas células son postmitóticas y emigran de la zona ventricular hasta las zonas intermedia y marginal; durante la etapa II, la placa neocortical aumenta en grosor y se hace más compacta, enmarcándose con las fibras de la zona intermedia, existiendo emigraciones celulares y aumento en la densidad de los axones. En la etapa III, la placa se divide en láminas; entre las semanas 11 a la 13, las células se distribuyen de manera heterogénea mostrando distintos grados de madurez. Durante la etapa IV, entre las semanas 13 y 15, la zona ventricular se adelgaza, y la zona intermedia se engruesa haciéndose más homogénea. Durante esta etapa muchas células llegan a la capa superficial. En la etapa V, que se inicia en la semana 16, sucede la maduración cortical, la cual termina durante el periodo neonatal; en esta etapa todavía se presenta la emigración neuronal, sin embargo, otras células están proliferando en la zona ventricular. La proliferación de estas células es importante durante la ontogenia, ya que estas producirán todas aquellas neuronas medianas y pequeñas, las cuales van a formar la población de interneuronas, cuya función es la regulación de los mecanismos moduladores por inhibición sináptica de los circuitos neuronales que configuran centros y núcleos funcionales, (por ejemplo las células productoras del neurotransmisor inhibitorio, ácido gamma amino butírico). Esta diferenciación

heterocrónica dentro del desarrollo cerebral dá como resultado un incremento sustancial de las interrelaciones celulares. De manera simultánea, se aumenta el número de células gliales, estableciéndose los linajes gliales, se diferencian las capas corticales y ocurre un proceso activo de sinaptogénesis (en la rata este proceso se prolonga hasta la sexta semana postnatal), estos eventos son conducentes a la formación de los diferentes plexos o estratos sinápticos dentro de la corteza.

Dentro de los procesos de crecimiento neuronal, es preponderante la presencia de los conos de crecimiento tanto axonales como dendríticos. El alargamiento de los mismos conlleva una serie de procesos extra e intracelulares que culminan con el establecimiento de conexiones específicas con el órgano blanco. Entre los mecanismos extracelulares que participan en el crecimiento del cono se encuentran las relaciones fibra-fibra, el orden cronológico de arribo y las clases funcionales de comunicación entre los elementos adyacentes. La concentración de factores tróficos y trópicos, identificados como sustancias guía, hace posible que un número limitado de sustancias puedan controlar el orden espacial de un gran número de fibras nerviosas. Otros factores tróficos externos que se sabe tienen papeles relevantes, aún cuando no se conocen bien su secuencia, temporalidad y mecanismo de acción, son cierto tipo de iones como el calcio, magnesio y potasio, proteínas de la matriz extracelular, hormonas y factores de crecimiento neuronal. Dentro de las respuestas intracelulares (genéticas) se identifican todos aquellos mecanismos autocatalíticos que involucran la actividad enzimática y de receptores, así como un autoensamblaje de estructuras del citoesqueleto. Por otra parte la interrelación de los factores externos e internos determina la complejidad, el orden espacial, la secuencia temporal y la especificidad de dichos eventos (Díaz-Cintra y Ortega, 1991).

FACTORES DE CRECIMIENTO

El desarrollo del Sistema Nervioso está controlado por la producción y muerte de neuronas. La neurogénesis se verifica por dos caminos, 1) proliferación de células neuronales precursoras en las zonas germinales o ganglios periféricos y 2) diferenciación de células precursoras hacia neuronas postmitóticas. El número de neuronas generadas durante las fases iniciales de proliferación y diferenciación es constante y específico para los diferentes núcleos del sistema nervioso central o ganglios definidos del sistema nervioso periférico. El número final de neuronas se obtiene durante el proceso de muerte neuronal selectiva, de la cual resulta una reducción sustancial del número de neuronas que se producen inicialmente. La extensión de la muerte neuronal se ha demostrado que depende del medio ambiente embrionario y del tamaño del blanco inervado.

El factor de crecimiento neuronal (FCN) es el agente neurotrófico y neurotrópico mejor caracterizado. Se produce tanto en el sistema nervioso periférico como en el central, en las células blanco de neuronas responsivas al factor de crecimiento neuronal y el inicio de su síntesis se correlaciona con el arribo de lo axones a esos blancos después de que las células se vuelven postmitóticas (Rohrer, 1990). El FCN no se restringe a sus efectos tróficos y trópicos sino que ha mostrado regular la síntesis de neurotransmisores y neuropéptidos en neuronas FCN-dependientes, induce la síntesis de enzimas específicas (acetilcolintransferasa, tiroxinhidroxilasa y dopamina beta hidroxilasa) y participa en la regeneración neural después del daño. Se sintetiza principalmente en las células de los tejidos blanco de las neuronas sensoriales y ganglionares de las neuronas simpáticas del SNP. Se sintetiza también en regiones del sistema nervioso central inervadas por neuronas de tipo colinérgico del cerebro basal (hipocampo, bulbo olfatorio, corteza cerebral, núcleos basales de Meynert y la

Banda Diagonal de Broca), el FCN promueve la sobrevivencia de las neuronas colinérgicas en cultivo y previene *in vivo* a éstas neuronas de la degradación después de la axotomía. Se sintetiza en las células de los tejidos blanco de las neuronas sensoriales ganglionares y de las neuronas simpáticas del SNP (Davies, 1991).

Las evidencias muestran que la infusión del FCN *in vivo* causa un aumento en la actividad de acetilcolintransferasa en el desarrollo del cuerpo estriado y del cerebro basal de la rata y previene la degeneración de las neuronas colinérgicas septales después de la sección de la fimbria del hipocampo. En ratas de edad avanzada, la infusión del FCN previene la atrofia de neuronas colinérgicas del cerebro basal y mejora las pruebas de memoria espacial (Hayashi *et al.*, 1990). Hay evidencias de que el FCN puede ejercer acciones locales sobre las neuronas colinérgicas del estriado tanto *in vivo* como *in vitro* estas neuronas responden con un incremento de actividad de acetilcolintransferasa (ChAT). Tanto el FCN y su receptor como el ARNm del FCN y su receptor se coexpresan en el desarrollo del cuerpo estriado en tiempos muy similares, semejante expresión se ha observado también en el desarrollo del cerebelo y del bulbo olfatorio.

La naturaleza química del factor de crecimiento neuronal fue descrita por Rita Levi-Montalcini y Hamburger en 1953 (en: Fahnstock, M. 1991), como un péptido que tiene un requerimiento máximo en un periodo definido del desarrollo del Sistema Nervioso, ya que estimula la división celular de precursores neuronales, su diferenciación, y la sobrevivencia de las neuronas diferenciadas. El Sistema Nervioso presenta además otros factores tróficos que tienen funciones semejantes a las del FCN, en general todos estos factores interactúan con receptores de la membrana celular que son específicos para la transducción de la señal química por un cambio metabólico particular en el interior de la célula. En el modo de acción del FCN se sabe que una variedad de vías de segundos mensajeros

son estimuladas, en algunos casos, la activación de proteinquinasa específica (Rumsby *et al.*, 1990; Pierre *et al.*, 1990) y la fosforilación de proteínas, se han demostrado que median las acciones fisiológicas agudas del FCN tal como el aumento en la síntesis de neurotransmisor. Hay evidencias de que la fosforilación protéica en la mediación del cambio de la expresión génica, lo cual es esencial para las acciones de largo plazo del FCN tales como el establecimiento de los mecanismos de potencial de acción y la generación de axones (Halegou *et al.*, 1991).

Entre otros factores de crecimiento celular que tienen efecto en el SNC o SNP o en ambos se encuentran: neurotrófico ciliar, neurotrófico derivado del cerebro, epidérmico, fibroblástico ácido y básico, insulina, similar a la insulina, neuroleucina, factor de maduración glial, nexina (derivada de la glía), interferón gamma, factor de crecimiento transformado, factor derivado de plaquetas e interleucinas 1,2 y 3 (Rohrer,1990; Lim, 1990; Avola *et al.*, 1990; Patel *et al.*, 1990; Alemán, 1991; Baghadassarian *et al.*, 1993, Hunter *et al.*, 1993; McKinnon *et al.*, 1993).

El factor neurotrófico ciliar (FNTC) junto con FCN son los únicos factores conocidos que tienen un efecto más inhibitorio que estimulador sobre la proliferación celular. El factor de crecimiento fibroblástico (FCF) es un potente factor de crecimiento neuronal que tiene efectos específicos sobre la división, diferenciación y sobrevivencia de células nerviosas específicas, además estimula a los astrocitos quiescentes a reentrar en el ciclo celular, la adquisición de la morfología estrellada y aumenta la expresión de la proteína fibrilar ácida glial (PFAG). (Rohrer, 1990).

El factor de crecimiento neuronal aparece en tiempos definidos en el SNC. En el hipocampo de la rata por ejemplo, se detecta una tercera parte en el día 16 embrionario, del valor encontrado en el adulto, alcanzando su máximo alrededor

del día 20 posnatal, y su mínimo durante la senectud (50% de los valores del adulto). El decremento del FCN en el estado adulto refleja probablemente la remoción del FCN por transporte retrogrado desde los tejidos blanco (Hayashi *et al.*, 1990).

Varias técnicas bioquímicas e inmunohistoquímicas han sido usadas para mostrar que cultivos primarios de fibroblastos, células de Schwann y astrocitos sintetizan y liberan FCN en el medio de cultivo (Davies, 1991, Bothwell, 1991). Sin embargo, se carece de evidencias de que esto suceda *in vivo*. Varias observaciones sugieren que la producción del FCN por éstas células ocurre como consecuencia de la remoción de su medio ambiente natural y a la separación de su asociación normal con las neuronas (Davies, 1991).

Se sabe que diversos tipos de daño cerebral estimulan la producción de FCN tales como lesiones quirúrgicas, hipoxia y secuestro límbico, en éste último caso la fuente del FCN es neuronal pero en los dos casos anteriores parece provenir de las células inflamatorias tales como astrocitos reactivos, microglia y macrófagos (Chao, 1991). Durante las lesiones, la expresión del FCN y su ARNm ocurre en dos fases, primero un incremento inicial en la síntesis del FCN seguido de un segundo aumento aparentemente debido a los efectos de la interleucina-1 (IL-1) liberada por los macrófagos infiltrados (Chao, 1991). El daño en la fimbria fornix produce un incremento significativo tiempo-dependiente de la proteína fibrilar ácida glial (PFAG) e inmunoreactividad PFAG en áreas específicas de la formación hipocampal. La mayoría de estos cambios son pasajeros y desaparecen después de 30 días post-lesión, esto refleja una actividad de los astrocitos. Las evidencias hacen suponer que los astrocitos producen y secretan factores neurotróficos que soportan la sobrevivencia y/o el crecimiento axonal de neuronas centrales y periféricas. A la fecha se sabe que solamente los astrocitos reactivos o los astrocitos en proliferación secretan factores tróficos y trópicos (Gage et al.,

1991).

La proliferación y activación microglial a menudo precede a la proliferación astrocítica, Giulian *et al.*, (1986, 1988a y b) han mostrado que la microglía activada produce IL-1 y que esta estimula la proliferación astrocítica *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado también que la IL-1 regula la síntesis del FCN en células no neurales del nervio ciático dañado y que esta es secretada desde los macrófagos activados en la vecindad del nervio dañado. Se han observado resultados semejantes en las poblaciones de astrocitos y microglía en la capa molecular externa del giro dentado desnervado, proponiéndose que: la degeneración terminal, activa a la microglía a fagocitar en la zona de degeneración, la microglía activa libera IL-1 dentro de su medio, la cual induce la proliferación de astrocitos, los astrocitos reactivos a su vez secretan factor de crecimiento neuronal el cual atrae a las fibras colinérgicas que expresan RFCN sobre sus membranas (Gage *et al.*, 1991).

Con base en los antecedentes de que el Sistema Nervioso Central de la rata adulta posee una capacidad de regeneración tisular y celular importantes después de una lesión, y que esta regeneración se realiza mejor después de introducir en la lesión tejido embrionario similar y factor de crecimiento neuronal, el **OBJETIVO GENERAL** del presente trabajo se fundamentó en la valoración tisular y celular de la glía en trasplantes homotópicos de corteza insular embrionaria de 16 días con y sin factor de crecimiento neuronal (FCN), en cerebro de ratas adultas a los 15 días postransplante.

Objetivos específicos

1. Valoración morfométrica y numérica de las células gliales en trasplantes

homotópicos de corteza insular de 15 días postransplante.

2. Analizar si la adición del factor de crecimiento neuronal en el tejido transplantado tiene algún efecto tanto en la morfología como en el número de las células gliales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 16 ratas macho adultas y 4 hembras gestantes de dos días, de la cepa Wistar de 250g de peso aproximadamente. Se mantuvieron en jaulas individuales con libre acceso al agua y al alimento, en cuartos de bioterio con ciclos 12:12 horas de luz-oscuridad.

Bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) las 16 ratas macho fueron lesionadas bilateralmente en la neocorteza gustatoria (áreas 13 y 14 de Krieg; en las coordenadas estereotáxicas: AP = +1.2, L = +/-5 y V = -5). Cada rata fue posicionada en el aparato estereotáxico y expuesto el cráneo; los orificios a través del hueso se realizaron con un motor y una fresa de dentista. La lesión cerebral se realizó con un electrodo monopolar de acero inoxidable, haciendo pasar una corriente anódica de 1 mA durante 60 segundos, posteriormente se limpió el cráneo y se suturó la piel. Después de 14 días de recuperación postoperatoria, los animales se dividieron en cuatro grupos de cuatro animales cada uno. Tres grupos recibieron trasplante homotópico bilateral de corteza insular y otro no lo recibió y se mantuvo como testigo (LESIÓN). Los trasplantes se realizaron de la siguiente manera: Bajo anestesia se extrajeron de la cavidad abdominal de las ratas preñadas, los fetos de 16 días (E-16), de los cuales se extrajeron los cerebros que se colectaron en suero fisiológico y bajo el microscopio se disecó el área temporoparietal (detrás del surco rinal) para transplantar. Fragmentos de 2 mm³ de este tejido se cargaron en una microjeringa Hamilton (100 µl) y se colocaron

estereotáxicamente en las mismas coordenadas del área lesionada, en el cerebro de las ratas experimentales previamente anestesiadas y preparadas para tal fin, en una de las tres condiciones siguientes: Un grupo recibió bilateralmente el trasplante de tejido fetal (TRANS); otro recibió simultáneamente el tejido fetal más el factor de crecimiento neuronal (FCN) disuelto en medio de cultivo modificado de Dulbecco-Eagle (DMEM) y se denominó como T+FCN; y el otro grupo recibió el trasplante más el vehículo (T+DMEM). El vehículo y el factor de crecimiento neuronal se aplicaron en una pequeña pieza de material reabsorbible (gelfoam), que sirvió al mismo tiempo para llenar la cavidad de la lesión y finalmente se limpió el cráneo y se suturó la piel. A los 15 días postrasplante las ratas de los tres grupos transplantados y testigo lesionado se sacrificaron para el análisis histológico.

Técnicas Histológicas.

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico, para ser perfundidos por vía intracardiaca con una solución amortiguada de formol al 10%. Después de 12 hs se disecó el cerebro y se separó un fragmento coronal de 4 mm de grosor que se seccionó en dos mitades simétricas. Se utilizaron solamente los fragmentos del hemisferio izquierdo de los que se hicieron cortes coronales de 20 μ m de grosor con un criostato (American Optical), para la aplicación de diferentes técnicas argentícas de Del Río-Hortega: la Doble impregnación en caliente y las específicas para astrocitos, oligodendrocitos, microglía, macrófagos, fibras nerviosas (variante Barroso-Moguel) y fibras reticulares (Estrada *et al.*, 1982).

Las preparaciones histológicas obtenidas se seleccionaron para su análisis cualitativo y cuantitativo, para lo cual se emplearon dos microscopios uno con cámara lúcida (American Optical) y un fotomicroscopio con óptica

planoapocromática (Zeiss); con los cuales se hicieron dibujos de los diferentes tipos celulares evidenciados con las diferentes técnicas y se tomaron series de fotomicrografías.

Valoración morfométrica.

Todos los datos morfométricos se determinaron por digitalización de imagen con el programa Histo 2000 del Sistema BIOCROM (Corkidi, G. 1989; Hirsh *et al.*, 1992).

El área de los trasplantes, su superficie y sus ejes mayor y menor se determinaron con un objetivo de 2.5X en 6 preparaciones de cada grupo (24 preparaciones). La valoración morfométrica de los tipos celulares se efectuó con un objetivo de 40X en áreas rectangulares equivalentes de $1700 \mu\text{m}^2$, en la zona adyacente a la corteza olfatoria. Por unidad de área, se cuantificaron y se midió el perímetro de los astrocitos, oligodendrocitos, células de microglía, macrófagos y neuronas, en doce campos de cada grupo, con la técnica específica para cada caso (60 preparaciones). De manera automática, el programa genera los datos del área, los diámetros mayor, menor y equivalente y el factor de forma (la unidad representa el círculo perfecto y mientras más pequeña es la fracción, más irregular es la célula). También, para cada grupo, se cuantificaron y se midieron los perímetros de los vasos sanguíneos mayores de $100 \mu\text{m}^2$ en los mismos doce campos y en la misma área (48 preparaciones), pero con un objetivo de 25X. Además se obtuvieron los datos morfométricos de las mitosis observadas en seis preparaciones de cada grupo transplantado (18 preparaciones), en toda el área del trasplante con un objetivo de 40X.

Los datos así obtenidos se procesaron con el paquete estadístico SPSS (Scientific Package of Social Sciences), y con el paquete gráfico Harvard

Graphics. Las pruebas estadísticas utilizadas para valorar las diferencias entre los distintos parámetros del tamaño de células y transplantes, y las densidades gliales, neuronales, vasculares y de células en mitosis, en las diferentes áreas y condiciones experimentales, fueron el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de Tuckey (Infante y Zárate, 1988).

RESULTADOS

Cualitativos:

Tamaño del transplante

Todos los transplantes presentaron diferente tamaño (Láminas 1, 2 y 3), siendo aquellos a los que se les adicionó el FCN los que se observaron mejor integrados, ya que en varios puntos no se observa la interfase fibrosa y glial (Lámina 4, figura 2).

Reacción inflamatoria y necrosis tisular

En el transplante de corteza insular embrionaria en el sitio de lesión (TRANS), se encontraron zonas más grandes de necrosis tisular, con grandes huecos y abundantes fibras reticulares. Se presentó además una gran cantidad de células inflamatorias pequeñas, entre ellas se destacan: microglía ramificada y en transformación, linfocitos, fibroblastos y abundantes macrófagos grandes y pequeños.

En estos como en todos los demás transplantes, en las áreas de destrucción tisular se presentó hemorragia, mayor infiltrado de células pequeñas y macrófagos,

mayor vascularización y fibrosis (fibras reticulares).

En los trasplantes a los que se les adicionó el vehículo (T+DMEM) se observaron áreas de destrucción tisular, pero no tan extensas como en los anteriores (Lámina 4, figura 1); la reacción celular inflamatoria fue extensa, con células pequeñas predominando la microglía amiboide y linfocitos (Lámina 7, figura 4); estas células se encontraron infiltradas extensamente incluso en áreas no necróticas.

En los trasplantes a los que se les adicionó el factor de crecimiento neuronal (T+FCN), las áreas de necrosis tisular fueron escasas, aunque de manera semejante a los trasplantes con DMEM, el infiltrado celular inflamatorio se observó por todo el trasplante con predominancia de microglía amiboide (Lámina 4, figura 4 y Lámina 8, figura 1).

En los testigos con lesión, la necrosis tisular fué muy reducida y estuvo limitada al borde de la lesión (Lámina 9, figura 1), la reacción inflamatoria fue pequeña comparada con los trasplantes y extendida a poca distancia del tejido necrótico. Sin embargo, hay que aclarar que en este caso como en todos los trasplantes se pudieron observar células inflamatorias aisladas o en grupos en cualquier área del corte, más comunmente cerca de vasos y en el tejido subependimario.

Vascularización y fibrosis

La mayor cantidad de vasos neoformados de diferentes tamaños se observaron en los trasplantes con FCN (lámina 4, figuras 2, 3 y 4), estando además uniformemente distribuidos por todo el trasplante, incluyendo la corteza insular. En los trasplantes con y sin vehículo la vascularización fue considerablemente menor, aproximadamente 1/3 de los anteriores y estuvieron restringidos a las áreas

necróticas o a la interfase transplante/huésped (Lámina 4, figura 1).

En todos los trasplantes, la fibrosis fue abundante en las áreas de mayor necrosis tisular, lo mismo que en las áreas de mayor vascularización y en los bordes del transplante (Lámina 4, figura 3). De manera adicional, en los trasplantes con FCN se observaron algunos pilares recorriendo a lo ancho el transplante, sin relación aparente con vasos ni tejido necrosado, dando la impresión de una cicatriz o una trabécula de refuerzo. También en estos trasplantes hubo tendencia a la desaparición de las fibras reticulares de los límites entre el transplante y el huésped.

Microglía y macrófagos

En la corteza insular lesionada se observó microglía ramificada semejante a la normal (Lámina 9, figura 2) y microglía en transformación (Lámina 9, figura 3), tanto en el tejido necrosado como en el normal cercano a la lesión; en el borde y en la cavidad de la lesión se presentaron abundantes macrófagos fagocíticos. La prueba de Sudán IV (aplicada sobre la impregnación para microglía), indicó que aproximadamente la tercera parte de los macrófagos fagocitaron mielina (Lámina 9, figuras 1 y 4); las otras dos terceras partes de los macrófagos no mostraron presencia de grasa en su citoplasma, sino cuerpos densos que al reaccionar con la plata se tornaron café o negro (Lámina 9, figura 4).

En TRANS se observó la mayor cantidad de células de microglía ramificada y en fases de transformación hacia macrófagos, se pudo observar la secuencia completa de cambios de la microglía descrita por Del Río-Hortega: células ramificadas, hipertróficas,seudopódicas, amiboides y macrófagos (Láminas 5, 6 y 10, esquema 2) . En todas las fases de transformación se pudieron observar cuerpos densos fagocitados (Lámina 5, figura 2). Se observaron también grandes y

pequeños macrófagos sin prolongaciones (Lámina 5, figura 2), algunos con grasa fagocitada y la mayoría con partículas pardas. Al parecer, en estos casos se trata de eritrocitos o restos de ellos (Lámina 6, figuras 2 y 4). La microglía y los macrófagos fueron más abundantes en las áreas necróticas, cerca de los vasos (Lámina 5, figura 2), hacia las meninges y en los bordes del transplante; sin embargo, también se presentó abundante microglía, sobre todo ramificada, cerca o abrazando a las neuronas (Lámina 5, figura 3). La microglía se observó mucho más abundante en el transplante que en el tejido huésped, en éste último predominó la microglía ramificada, pero cabe mencionar que aunque escasa, pudo encontrarse microglía en transformación o transformada en cualquier área del corte.

En T+FCN se observó la mayor cantidad de microglía, pero sólo se observó microglía amiboide (Lámina 8, figura 1 y Lámina 10 esquema 1). Tampoco en el T+DMEM se observó microglía ramificada, pero sí gran cantidad de microglía amiboide (Lámina 7, figura 3) y macrófagos. En ambos transplantes la microglía amiboide se encontró por todo el transplante, más abundante cerca de los vasos sanguíneos (Lámina 7, figura 3 y Lámina 8, figura 1), en las áreas de necrosis tisular y bordeando a las neuronas (Lámina 8, figura 3). Los macrófagos fueron abundantes en las áreas de destrucción y en el borde del transplante (Lámina 7, figura 4 y Lámina 8, figura 4). En el tejido huésped pudo encontrarse microglía ramificada, en ocasiones hipertrófica.

En todos los casos, la densidad microglial fue mucho mayor en el transplante que en el huésped.

Por lo que respecta a los macrófagos estos se presentaron en todos los transplantes y lesión, más abundantes en la lesión y menos en el T+FCN, fueron muy abundantes en las cavidades de la lesión (Lámina 9, figuras 1 y 4) y en las áreas de necrosis tisular de los transplantes (Lámina 7, figura 4), también en el borde de los transplantes (Lámina 8, figura 4) y en las zonas vasculares mayores

(Lámina 8, figura 1 y Lámina 10, esquemas 3 y 4).

Astroцитos

La astrogliosis fue menor en la lesión que en los transplantes. Los astroцитos en todos los casos fueron de dos tipos: protoplásmicos (Lámina 11, figuras 2, 4 y 5) y fibrosos (Lámina 11, figuras 1 y 3). Los primeros fueron en general células sueltas con pocas prolongaciones (3-5); pocas veces se observaron dos células acopladas, por su morfología fueron células semejantes a fibroblastos (Lámina 11, figuras 4 y 5), los cuales predominaron sobre todo en los transplantes con FCN. El tipo fibroso, de morfología estrellada, y con abundantes prolongaciones (6-12), (Lámina 11, figuras 1 y 3), fué abundante en el transplante solo y en el transplante con vehículo, sobre todo en este último en donde mostraron un alto grado de acoplamiento (Lámina 11, figura 1); en la lesión y en el T+ FCN fueron escasos. En la lesión las prolongaciones de los astroцитos se observaron dirigidas hacia ella (Lámina 11, figura 5), y en los transplantes estuvieron distribuidos con cierta regularidad (Lámina 11, figura 2 y Lámina 12, esquema 2), más abundantes hacia el borde del transplante y hacia los vasos, excepto en el transplante con vehículo, donde los astroцитos fibrosos forman una red por todo el transplante (Lámina 11, figura 1 y Lámina 12, esquema 1).

Oligodendrocitos.

En todos los transplantes fue difícil visualizar a los oligodendrocitos en el interior del transplante, de ellos sólo se observaron los núcleos rodeando a las neuronas y cercanos a los vasos (Lámina 13, figuras 3 y 4). Sin embargo en el tejido huésped si se observaron oligodendrocitos con prolongaciones cortas y

escasas, sobre todo entre las fibras nerviosas de la cápsula interna y en los estriomas del cuerpo estriado (Lámina 13, figuras 1 y 2).

Sorprendentemente, en los trasplantes con vehículo se pudieron observar algunos oligodendrocitos con prolongaciones rodeando a neuronas y a vasos sanguíneos (Lámina 13, figura 4).

La densidad de núcleos de oligodendrocitos fue mayor en el trasplante con FCN que en todas las demás condiciones, seguido del trasplante con DMEM donde también se observó alta densidad oligodendroglial.

Mitosis

Un importante resultado en este trabajo fue la presencia de abundantes mitosis (Lámina 15, figura 1), en el trasplante con factor de crecimiento neuronal (38 mitosis en 6 preparaciones), comparadas con las 5 mitosis observadas en el trasplante con DMEM y la única mitosis observada en el trasplante solo, en el mismo número de preparaciones. Por su tamaño las mitosis observadas en el trasplante y en el trasplante con vehículo parecen pertenecer a células de glía, quizás a astrocitos y oligodendrocitos (Lámina 14), mientras que de las mitosis observadas en el trasplante con FCN, la 4/5 partes pertenecen a células grandes, que por su tamaño parecen pertenecer a precursores neuronales (Lámina 15), y 1/5 parecen pertenecer a células gliales, probablemente oligodendrocitos o astrocitos. En el tejido lesionado no se observó ninguna mitosis.

Neuronas y fibras nerviosas

En TRANS y en T+DMEM se observaron abundantes fibras desordenadas y escasos tractos nerviosos (Lámina 17, figuras 1 y 2), mientras que en los T+FCN

LÁMINAS

LÁMINA 1

Transplante. 31X. Doble impregnación de Del Rio-Hortega.

Porción anterior del cerebro de rata en corte coronal, a nivel de la Corteza insular.

El transplante es muy grande, está bien integrado y escasamente vascularizado (v). Obsérvese el límite del transplante (---), la corteza olfatoria (CxO), el cuerpo estriado (Ce), la corteza frontal (Cf), la comisura anterior (Ca) y el tercer ventriculo (3°).



LÁMINA 2

Transplante + DMEM. 31X. Doble impregnación de Del Río-Hortega.

Porción anterior del cerebro de rata en corte coronal, a nivel de la corteza insular.

El transplante es grande, está bien integrado y pobremente vascularizado (v) entre el borde del transplante y el límite del cerebro se observa el gelfoam (g) que no ha sido reabsorbido. Obsérvese el límite del transplante (---), el surco rinal (sr) y la corteza olfatoria (CxO) y el cuerpo estriado (Ce).

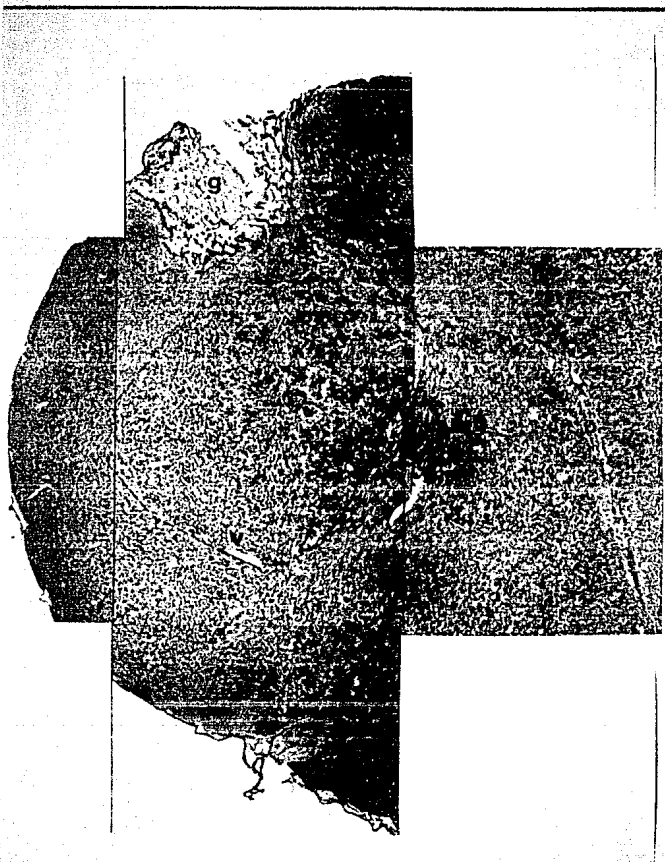


LÁMINA 3

TRANSPLANTE + FCN. 31X. Doble impregnación de Del Río-Hortega.

Porción anterior del cerebro de rata en corte coronal, a nivel de la corteza insular.

El trasplante es grande, está bien integrado y abundantemente vascularizado (v). Las flechas demarcan el área de la cual se tomaron dos campos de 1700 μm^2 para hacer las cuantificaciones y morfometría celulares y vasculares. Las líneas punteadas muestran el límite del trasplante.

Obsérvese la corteza olfatoria (CxO), la corteza frontal (Cf), el cuerpo estriado (Ce) y la comisura anterior (Ca).



LÁMINA 4. VASCULARIZACIÓN

Figura 1

Transplante + DMEM. 31X. Doble impregnación de Del Río-Hortega. El transplante (T) está poco vascularizado (v). Los vasos se observan principalmente en áreas inflamatorias o necróticas y en el borde del transplante. Tejido huésped (H).

Figura 2

Transplante + FCN. 31X. Doble impregnación de Del Río-Hortega. La abundante vascularización (v) está distribuida regularmente por todo el transplante y no está restringida a ciertas áreas. Tejido huésped (H).
Transplante (T).

Figura 3

Transplante + FCN. 200X. Técnica para fibras reticulares de Del Río-Hortega. Abundantes vasos (v) cerca del borde del transplante, obsérvense las fibras reticulares (fr) que forman sus paredes.

Figura 4

Transplante + FCN. 200X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Abundantes vasos grandes (V) y pequeños (v) distribuidos homogéneamente por todo el transplante. Obsérvense las células endoteliales que limitan la luz de los vasos (e). El infiltrado de células inflamatorias (I) se observa más abundante cerca de los vasos.

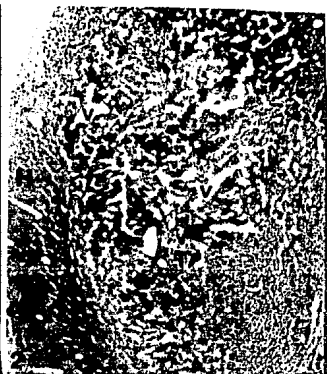


LÁMINA 5. MICROGLÍA Y MACRÓFAGOS

Figura 1

Transplante. 500X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Microglía ramificada (M) asociada a las neuronas (N), quizás en una fase temprana de señalización.

Figura 2

Transplante. 500X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Macrófagos (m) y microglía seudopódica (M) congregada cerca de los vasos sanguíneos (v). Neuronas (N).

Figura 3

Transplante. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Microglía ramificada (I) envolviendo a la neurona (N). Se menciona un proceso de señalización temprana que se da durante estos contactos.

Figura 4

Transplante. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Microglía ramificada (I) cercana a una neurona en degeneración (N).

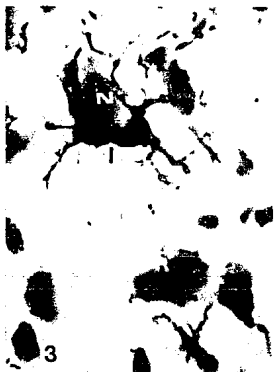


LÁMINA 6. MICROGLÍA Y MACRÓFAGOS

Figura 1

Transplante. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Microglía seduopódica (II) y ameboide (III) con una prolongación. Núcleo de neuronas (N).

Figura 2

Transplante. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Microglía amiboide (III) con prolongaciones y macrófago (IV). Obsérvense los cuerpos densos fagocitados por la microglía amiboide.

Figura 3

Transplante. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Microglía amiboide hipertrófica (III) y ramificada (I). Neurona (N) abrazada por la microglía ramificada.

Figura 4

Transplante. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Microglía amiboide (III) con prolongaciones y macrófago (IV). Obsérvense el material fagocitado por el macrófago.

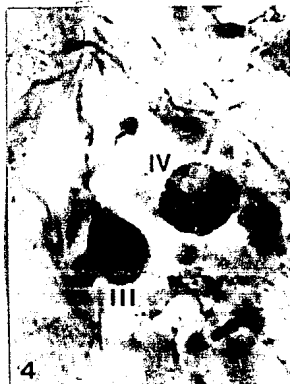
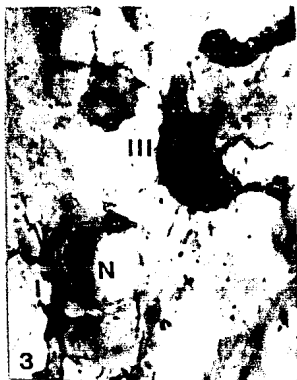
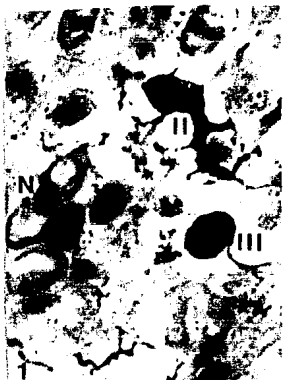


LÁMINA 7. MICROGLÍA Y MACRÓFAGOS

Figura 1

Transplante + DMEM. 500X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega.
La microglía ramificada (M) es escasa en estos transplantes.

Figura 2

Transplante + DMEM. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega.
La microglía ramificada (M) hipertrófica es escasa en estos transplantes.

Figura 3

Transplante + DMEM. 500X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega.
Microglía seudopódica y amiboide (M). Es el tipo de microglía que predomina en estos transplantes.

Figura 4

Transplante + DMEM. 200X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega
Macrófagos (en amarillo) y células infiltradas (I) en áreas de gran deterioro tisular.



LÁMINA 8. MICROGLÍA Y MACRÓFAGOS

Figura 1

Transplante + FCN. 500X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Vasos sanguíneos (v) del transplante rodeados por células de microglía amiboide (M), macrófagos (en amarillo) y otras células inflamatorias (I). Este aspecto es común por todo el transplante.

Figura 2

Transplante + FCN. 500X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Microglíaseudopódica (M). Estas células se muestran escasas y se aprecian cerca de las neuronas (N).

Figura 3

Transplante +FCN. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Microglíaseudopódica (M). Este tipo de microglía fue escasa en estos transplantes, abundando la microglía amiboide sin prolongaciones. Neurona (N).

Figura 4

Transplante + FCN. 500X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Macrófagos (m) y células inflamatorias (I). Estas últimas estuvieron presentes por todo el transplante, los macrófagos fueron más escasos que en los otros transplantes y la lesión.



LÁMINA 9. MICROGLÍA Y MACRÓFAGOS

Figura 1

Lesión. 200X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega/Sudán IV. El tejido lesionado (---) se observa hialino con abundantes células de microglía (M) ramificada y macrófagos. Las células que han fagocitado grasa (mielina) se visualizan en rojo. Tejido no lesionado (H). Lesión (L).

Figura 2

Lesión. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Microglía (M) cercana a una neurona (N), en tejido sano, adyacente a la lesión.

Figura 3

Lesión. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Microglía (M) ramificada e hipertrofica del tejido lesionado.

Figura 4

Lesión. 500X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega/Sudán IV. Macrófagos (m) en la cavidad de la lesión que han fagocitado mielina (rojos) y otros que han fagocitado cuerpos densos (amarillos). Los macrófagos de la lesión destacan de los de los transplantes por contener mayor cantidad de mielina.



4

LÁMINA 10. MICROGLÍA Y MACRÓFAGOS

Esquema 1

Transplante + FCN. 400X.

Microglía amiboide (M) con escasas prolongaciones cercanas a las neuronas (N). Este tipo de microglía fué predominante en los transplantes con FCN y los transplantes con vehículo. Vasos (v).

Esquema 2

Transplante. 400X

Células de microglía (M) en diferentes fases de transformación hasta macrófagos (m), cercanas a las neuronas (N).

Esquema 3

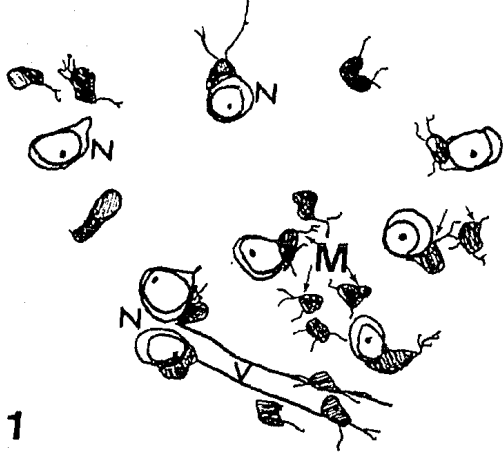
Transplante + FCN. 400X

Macrófagos (m) cercanos a un vaso (v) y células infiltradas (I). En los transplante con FCN y con vehículo no se observó la transición entre microglía amiboide y macrófagos. Neuronas (N).

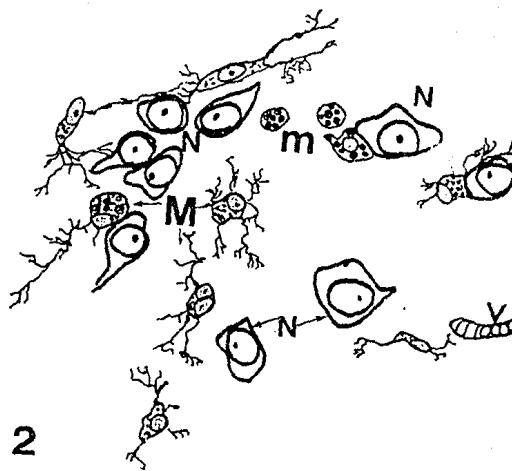
Esquema 4

Transplante. 400X

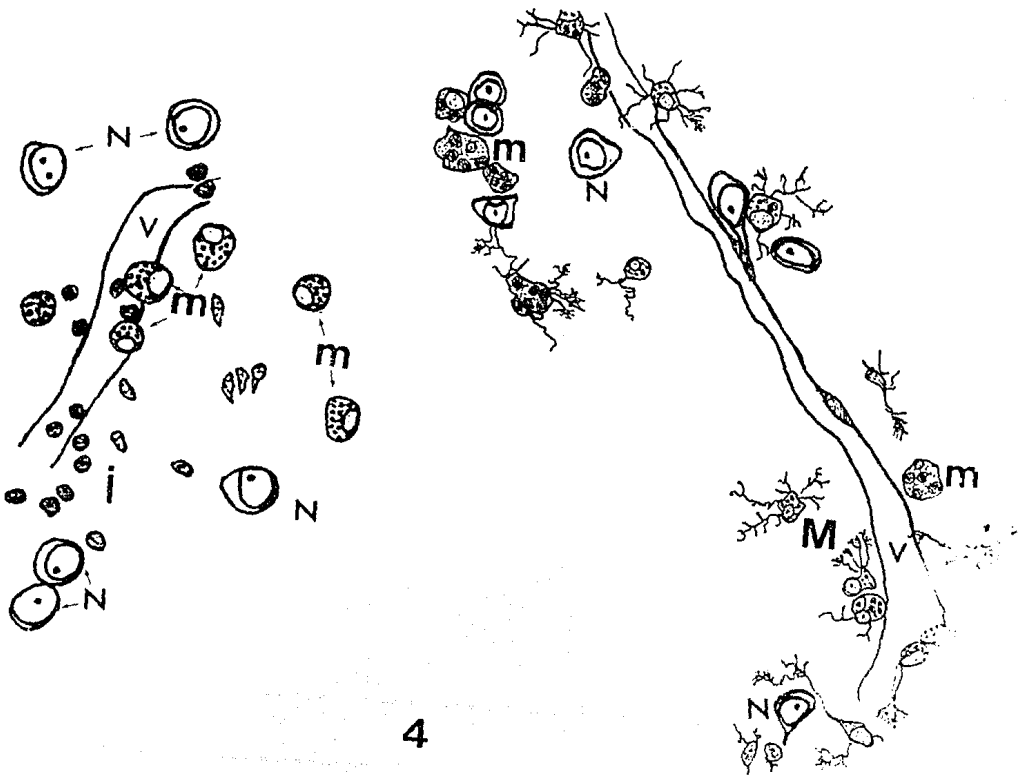
Microglía (M) en diferentes fases de transformación hasta macrófagos (m) en áreas vasculares (v). Neuronas (N).



1



2



4

LÁMINA 11. ASTROCITOS

Figura 1

Transplante + DMEM. 500X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega. Astrocitos (A) fibrosos y estrellados muy abundantes, que forman una red por todo el transplante. Obsérvense en el fondo los somas neuronales (N).

Figura 2

Transplante + FCN. 500X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega. Astrocitos (A) protoplásmicos y sueltos, que fueron los predominantes en estos transplantes. Neuronas (N).

Figura 3

Transplante + DMEM. 1250X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega. Astrocitos (A) fibrosos, estrellados y acoplados, que forman una red continua por todo el transplante. Neuronas (N).

Figura 4

Transplante + FCN. 1250X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega. Astrocito (A) protoplásmico, este tipo de astrocitos se encontraron distribuidos regularmente por todo el transplante.

Figura 5

Lesión. 1250X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega. Astrocitos (A) protoplásmicos, localizados únicamente en el borde de la lesión.

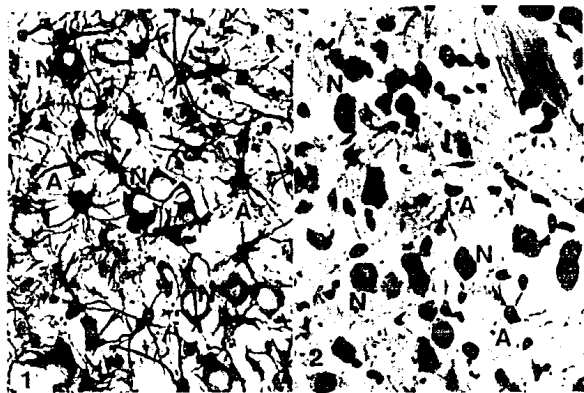


LÁMINA 12. ASTROCITOS

Esquema 1

Transplante + DMEM. 400X.

**Astrocitos (A) fibrosos predominantes en los transplantes con vehículo.
Neuronas (N).**

Esquema 2

Transplante + FCN. 400X.

Astrocitos (A) protoplásmicos, semejantes a fibroblastos, predominantes en los transplante con FCN, en los transplantes solos y en las lesiones. Vasos (v), neuronas (N).



LÁMINA 13. OLIGODENDROCITOS

Figura 1

Transplante + FCN. 500X. Técnica para oligodendroglía de Del Río-Hortega. Campo del cerebro huésped que pertenece al cuerpo estriado, obsérvense los oligodendrocitos (o) en los estriosomas (e). En el transplante se pudieron observar solamente los núcleos de los oligodendrocitos.

Figura 2

Lesión. 1600X. Técnica para oligodendroglía del Del Río-Hortega. Oligodendrocito (o) del tejido normal, adyacente a la lesión, ya que en la zona lesionada no se observaron.

Figura 3

Transplante + DMEM. 500X. Técnica para oligodendroglía de Del Río-Hortega
Neurona (N) y vaso (v) rodeados por oligodendrocitos (o)

Figura 4

Transplante + DMEM. 1250X. Técnica para oligodendroglía de Del Río-Hortega.
Neuronas (N) del transplante rodeadas por oligodendrocitos (o) con pequeñas prolongaciones (*), únicamente observadas en estos transplantes. Nótese el pequeño tamaño de estos oligodendrocitos (y de todos los transplantes) en comparación con los oligodendrocitos de huéspedes adultos de las figuras 1 y 2.

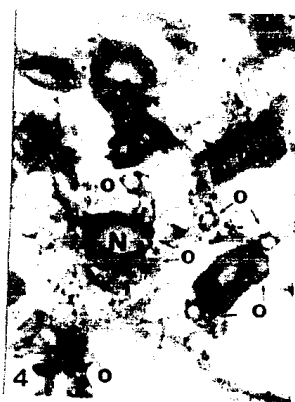


LÁMINA 14. MITOSIS

Figura 1

Transplante + DMEM. 500X. Técnica para microglía del Del Río-Hortega. Célula pequeña en telofase (mi). Neuronas (N) y células de microglía (M).

Figura 2

Transplante + DMEM. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Aumento de la figura anterior. Mitosis (mi), neurona (N) y microglía aniboide (M).

Figura 3

Transplante + DMEM. 1250X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega. Mitosis (mi) en profase, de una célula pequeña. Astrocitos protoplásmicos (A) y microglia (M).

Figura 4

Transplante + DMEM. 1250X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega. Astrocitos fibrosos (A), el astrocito del lado derecho muestra su núcleo en mitosis (mi).

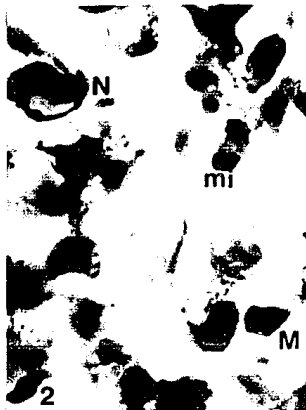


LÁMINA 15. MITOSIS

Figura 1

Transplante + FCN. 200X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega. Cinco células en mitosis (mi) en el T + FCN; en el T + DMEM escasamente se encontró una mitosis por corte y en TRANS una mitosis en seis cortes.

Figura 2

Transplante + FCN. 500X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega. Dos células en profase (mi). Núcleos de neuronas (N) y núcleos de astrocitos (A).

Figura 3

Transplante + FCN. 1250X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega. Célula en profase (mi) cuyo citoplasma muestra una prolongación. Astrocito protoplásmico (A), núcleo de neurona (N).

Figura 4

Transplante + FCN. 1250X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega. Núcleo en profase (mi), núcleo de neurona (N), núcleo de microglía (M) y astrocito protoplásmico (A).

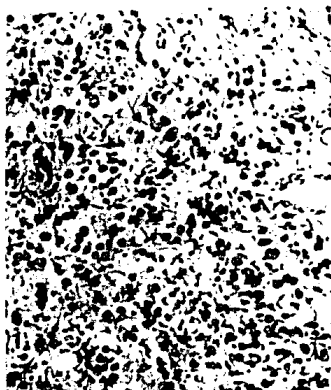


LÁMINA 16. NEURONAS.

Figura 1

Transplante. 500X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega.
Densidad, tamaño y forma de las neuronas (N) en TRANS. Astrocitos (A).

Figura 2

Transplante + DMEM. 500X. Técnica para microglía de Del Río-Hortega.
Neuronas (N) grandes y escasas semejantes a las de TRANS. Núcleos de
microglía amiboide (M).

Figura 3

Transplante + FCN. 500X. Técnica para astrocitos de Del Río-Hortega.
Neuronas (N) más abundantes y de menor tamaño con respecto a los otros
dos transplantes. Obsérvese una mitosis en profase (mi), vasos sanguíneos (v)
y células inflamatorias (I).

Figura 4

Lesión. 500X. Doble impregnación de Del Río-Hortega.
Neuronas (N) del tejido huésped adyacente a la lesión. Obsérvese neuronas
de forma y tamaño semejante a las del T+FCN aunque con densidad
considerablemente menor. Vaso sanguíneo (v).

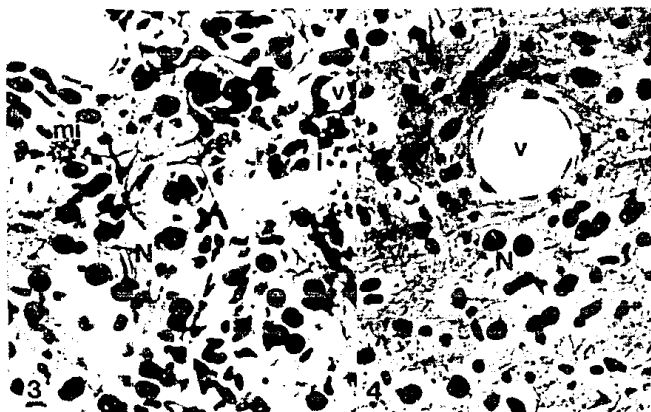
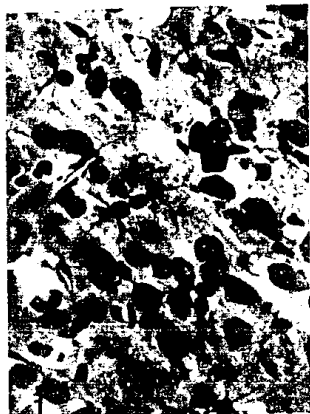


LÁMINA 17. FIBRAS NERVIOSAS

Figura 1

Transplante. 500X. Variante Barroso-Moguel para fibras nerviosas.
Tractos nerviosos (TN) escasos se observan en este transplante así como
fibras nerviosas (F) desordenadas y escasas.

Figura 2

Transplante + DMEM. 500X. Variante Barroso-Moguel para fibras nerviosas
Tractos nerviosos (TN) escasos se observan en este transplante y mayor
número de fibras nerviosas (F) desordenadas.

Figuras 3 y 4

Transplante + FCN. 500X. Variante Barroso-Moguel para fibras nerviosas.
Tractos nerviosos (TN) abundantes se observan en este transplante, las fibras
nerviosas (F) tienden a marchar en haces, se sigue advirtiendo la
vascularización (v) abundante que caracteriza a este transplante.



se observaron abundantes tractos nerviosos y fibras más ordenadas (Lámina 17, figuras 3 y 4).

Las neuronas son más abundantes en los trasplantes con FCN en relación con sus controles (Lámina 16, figuras 1 y 2) y al testigo (Lámina 16, figura 4).

Cuantitativos

Trasplantes

Se valoraron y compararon estadísticamente el perímetro, el área y los diámetros mayor y menor, encontrando disminuciones significativas del 15% y 19% respectivamente en el diámetro menor de los trasplantes con FCN y DMEM en relación a TRANS (Tabla 1).

Vascularización

El número de vasos sanguíneos se encontró aumentado de manera significativa en los grupos tratados con FCN y DMEM. Los aumentos en relación al grupo no tratado (TRANS) fueron del 350% para el grupo de FCN y del 106% para el grupo de DMEM. La comparación entre ambos grupos tratados mostraron aumento del 120% para el grupo con FCN (Tabla 2 y Gráfica 1). El aumento significativo del 11% y 8% en el factor de forma de los vasos del T+DMEM con respecto al T+FCN y a TRANS indica que los vasos en T+DMEM son significativamente más redondos que en los otros dos trasplantes (Tabla 2 y Gráfica 1).

De todos los tipos celulares (astrocitos, oligodendrocitos, microglía, macrófagos neuronas) y mitosis se compararon las cuentas y los datos morfométricos encontrándose los siguientes resultados:

Microglía

El número de células de microglía fue significativamente mayor en el grupo con FCN (25%) en relación al grupo con DMEM.

Perímetro. El T+FCN mostró aumento significativo respecto a la lesión (8%) y disminución respecto al TRANS (18%); el T+DMEM mostró la misma tendencia con aumento del 16% en relación a la lesión y disminución del 16% en relación al TRANS, mostrándose en este último mayor en un 25% respecto a la lesión.

Area. Todos los transplantes mostraron aumentos significativos respecto a la lesión, siendo mayores en el TRANS (35%), en el T+DMEM (19%) y en el T+FCN (33%). Además el T+DMEM mostró disminución significativa del 10% en comparación al T+FCN y del 12% respecto a TRANS.

Factor de forma. En TRANS y T+DMEM se encontraron disminuciones significativas del 13% y 6% respecto a la lesión, y en T+FCN y T+DMEM aumentos significativos del 13% y 7% respectivamente en relación a TRANS. Esto indica en términos generales que la forma más irregular (ramificada) se mostró en TRANS (Láminas 5 y 6) y la menos ramificada en la lesión. (Tabla 3, Gráfica 2).

Diámetro equivalente. Mostró aumentos significativos en los transplantes respecto a la lesión, con valores de 15% en el TRANS y el T+FCN y del 9% en el T+DMEM, este último mostró además, disminución significativa del 5% en relación a los otros dos transplantes.

Diámetro mayor. Este parámetro fue significativamente mayor en el TRANS (22%), en el T+DMEM (14%) y en el T+FCN (15%) en relación a la lesión; el T+DMEM y el T+FCN mostraron además una disminución significativa del 7% y 6% respectivamente en comparación con el TRANS.

Diámetro menor. Al igual que los otros parámetros mostró aumentos

significativos en los trasplantes con respecto a la lesión, siendo del 18%, 9% y 16% en TRANS, T+DMEM y T+FCN respectivamente. Asimismo, el T+DMEM se mostró disminuido de modo significativo respecto al T+FCN (6%) y al TRANS (8%). (Tabla 3 y Gráfica 3).

Macrófagos

Su número se encontró disminuido de manera significativa en todos los trasplantes respecto a la lesión, con valores de 80%, 74% y 190% en TRANS, T+DMEM y T+FCN respectivamente.

En los parámetros morfométrico, el factor de forma mostró aumento significativo del 3.5% en el T+DMEM respecto a la lesión, siendo en el primero más redondeados (Tabla 4 y Gráfica 1).

Astroцитos

Su número mostró aumentos significativos del 63% en el T+DMEM, y del 48% en el T+FCN con respecto a la lesión, encontrándose la mayor astrogliosis en el trasplante con el vehículo (Lámina 11, figura 1 y Lámina 12, esquema 1).

Perímetro. Mostró aumentos significativos del 25%, 23% y 16% en el T+DMEM en relación a TRANS.

Area. Fué significativamente mayor en el T+DMEM en relación a la lesión (22%) y a TRANS (24%).

Factor de forma. La disminución significativa de este factor en el T+DMEM en relación a la lesión (11%), TRANS (19%) y T+FCN (18%), indica que los astroцитos más estrellados fueron los de T+DMEM (Lámina 11, figura 1 y 3). El aumento significativo del factor de forma en TRANS (9%) y T+FCN (8%)

respecto al testigo indicó que en las lesiones se encontraron los astrocitos menos estrellados (Lámina 11, figura 5).

Diámetro equivalente. Presentó aumento significativo de T+DMEM del 12% respecto a la lesión, y del 10% respecto a TRANS; asimismo, el T+FCN se mostró un 7% mayor en relación a la lesión.

Diámetro mayor. Indica aumentos significativos del 12%, 17% y 13% en el T+DMEM en comparación con la lesión, TRANS y T+FCN.

Diámetro menor. Fue mayor significativamente en el T+DMEM en relación a la lesión (20%), TRANS (16%) y T+FCN (7%), por su parte el T+FCN mostró aumento significativo del 12% respecto a la lesión; y el TRANS mostró una disminución significativa del 8% respecto al T+FCN. (Tabla 5 y Gráficas 4 y 5).

Oligodendrocitos

El número de oligodendrocitos resultó significativamente mayor en T+FCN respecto a TRANS (80%) y lesión (60%); y en el T+DMEM respecto a TRANS (67%) y lesión (48%).

En todos los trasplantes se encontraron disminuciones significativas en todos los parámetros morfométricos (excepto diámetro mayor) respecto a la lesión con los siguientes valores:

Perímetro. En el T+FCN disminuyó 3% y en TRANS disminuyó 4%.

Área. En TRANS, T+DMEM y T+FCN fue menor en 14%, 12% y 12% respectivamente.

Factor de forma. En TRANS, T+DMEM, y T+FCN mostró disminuciones del 7%, 7% y 6% respectivamente.

Diámetro equivalente. En el TRANS, el T+DMEM y el T+FCN las disminuciones fueron del 8%, 7% y 6% respectivamente.

Diámetro menor. En el TRANS, el T+DMEM y el T+FCN disminuyó en 10%, 9% y 10% respectivamente (Tabla 6 y Gráficas 6 y 7).

En términos generales estos resultados indican que los oligodendrocitos de la lesión son significativamente más redondos y más grandes (Lámina 13, figuras 1 y 2) que los oligodendrocitos de los transplantes (Lámina 13, figuras 3 y 4).

Neuronas

En cuanto a número mostraron aumentos significativos en el T+FCN respecto a las otras condiciones, 318% respecto a la lesión, 213% respecto al T+DMEM y 66% respecto a TRANS; además este último mostró un aumento significativo del 150% respecto a la lesión.

En todos los parámetros morfométricos se encontró una disminución significativa en T+FCN y lesión respecto al transplante solo y al transplante con vehículo.

Perímetro. En el T+FCN fue 19% menor que en el T+DMEM y que en TRANS; en la lesión fue 20% menor que en el T+DMEM y que en TRANS.

Area. En el T+FCN fue 45% y 43% menor que en el T+DMEM y TRANS respectivamente. En la lesión fue 55% y 53% menor que en T+DMEM y TRANS respectivamente.

Diámetro equivalente. En el T+FCN fue 18% y 17% menor que en T+DMEM y TRANS respectivamente; asimismo en la lesión fue 27% menor que en el T+DMEM y 23% menor que en TRANS.

Diámetro mayor. En el T+FCN fue 20% menor que en T+DMEM y TRANS y en la lesión 21% menor que en T+DMEM y TRANS.

Diámetro menor. En el T+FCN se mostró 16% y 15% menor que en el T+DMEM y TRANS y respecto a la lesión 23% y 22% menor en T+DMEM y TRANS. (Tabla 7 y Gráficas 8 y 9).

Estos resultados indican que morfológicamente las neuronas del T+FCN son semejantes a las de la lesión (Lámina 16, figuras 3 y 4) y diferentes a las de TRANS y T+DMEM, las que son semejantes entre sí (Lámina 16, figuras 3 y 4).

Mitosis

Se encontró un aumento significativo en el número de mitosis en el T+FCN (Lámina 15, figuras 1 y 2), respecto a los otros dos transplantes; morfológicamente, se encontraron aumentos significativos de 85% en área, 6% en factor de forma, 33% en diámetro equivalente y 41% en diámetro menor en el T+FCN respecto al T+DMEM. Las diferencias con TRANS, aunque evidentes, no se muestran por haberse encontrado solamente una mitosis y no haberse podido obtener el error estándar. (Tabla 8 y Gráficas 10 y 11).

DISCUSIÓN

Transplantes

Los transplantes homotópicos en la corteza insular de 15 días posttransplante, de modo semejante a lo reportado por Bragin *et al.*, en 1988, en transplantes de 3 a 6 meses en la corteza somatosensorial, sobreviven en un alto porcentaje (96%); algunos protruyen ligeramente sobre la superficie pial (Lámina 1), muestran límites evidentes en la interfase transplante-huésped (Lámina 4, figura 1), existiendo pocas áreas no limitadas (Lámina 4, figura 2).

Por otra parte, de manera general, nuestras observaciones indican que en los trasplantes de 15 días hay diferencias en la densidad neuronal, glial y áreas necróticas, respecto al huésped; encontrándose además diferencias entre los trasplantes en las distintas condiciones de este trabajo.

Microglia

Como indican Costero (1929, 1930, 1931), Giulian (1990, 1993) y Banati *et al* (1993), la microglía amiboide y los macrófagos participan en la regulación del medio ambiente glial durante la recuperación del daño en el Sistema Nervioso Central. Estas células están comprometidas con una variedad de actividades que incluyen eliminación de detritos, liberación de factores de crecimiento astrogliar (interleucina 1) y secreción de citotoxinas (anión superóxido, proteasas y factores de necrosis tumoral). La preponderancia de microglía amiboide en el trasplante con factor de crecimiento neuronal y en el trasplante con vehículo y la mayor densidad total de microglía en el primero (Lámina 8, figura 1), pudiera indicar una mayor secreción de interleucina-1, que es una citocina pluripotente que actúa como pirógeno endógeno, activador linfocítico, mitógeno fibroblástico y mitógeno astrogliar; si este fuera el caso, se esperaría un mayor infiltrado celular (Lámina 8, figura 4) y una gran cantidad de astrocitos (Lámina 12, esquema 2), y efectivamente en los dos casos se observa una astrogliosis mayor (Lámina 12, esquemas 1 y 2) y una respuesta inflamatoria más severa, caracterizada por un abundante infiltrado de células inflamatorias, por todo el trasplante.

La gran cantidad de microglía ramificada y pseudopódica observada tanto en la lesión como en TRANS, sobre todo en este último (Lámina 5), sugiere que su actividad como células productoras de interleucina-1 es menor y por lo tanto hay menor respuesta astrocítica e inflamatoria, esto se apoya también en la observación

de que la microglía en transformación y transformada de TRANS está ocupada principalmente en la eliminación de detritos, como lo muestra la gran cantidad de cuerpos densos observados al interior de estas células (Láminas 5 y 6) a diferencia de los T+DMEM y T+FCN, en donde la microglía amiboide no parece contener material fagocitado en su interior (Lámina 7, figura 3 y Lámina 8, figura 1 y 3).

Macrófagos

Como hay lesión vascular severa, es de esperarse que algunos de los macrófagos encontrados en el tejido nervioso de los transplantes y huésped sean de origen hemático, principalmente derivados de monocitos como lo sugieren Konigsmark y Sidman (1963), Maxwell y Kruger (1965), Mori y Leblond (1969).

Sin embargo, concordamos con Giulian (1990) en que los macrófagos de origen hemático (marcados por ellos previamente con carbón) aparecen temprano en las lesiones y los macrófagos endógenos (células de microglía amiboides) con receptores lipoproteicos acetilados de baja densidad (DiI-ac-LDL)+, esterasa inespecífica + y sin partículas de carbón son evidentes hasta 48 horas después de la lesión, lo que sugiere que la mayor parte de los macrófagos que aparecen después de dos días representan la conversión de microglía ramificada en macrófagos como lo sugirieron Del Río-Hortega (1919, 1921) y Costero (1929, 1930, 1931, 1946), como se pudo observar claramente en el trasplante solo (Láminas 5 y 6).

La gran densidad de macrófagos en la lesión y preponderancia de grasa en su citoplasma indica que estas células estuvieron ocupadas principalmente en la fagocitosis de mielina (Lámina 9, figura 4); en contraparte, en los transplantes se observó que los macrófagos fagocitaron fundamentalmente células muertas y detritos celulares (Lámina 6, figura 2, Lámina 7, figura 4 y Lámina 8, figura 4). La

disminución dramática de macrófagos en el T+FCN sugiere que en estos trasplantes hay menos material fagocitable y por lo tanto están mejor integrados.

Astroцитos

Según nuestros resultados los astroцитos observados son de dos tipos fibrosos (estrellados) y protoplásmicos (parecidos a fibroblastos), pudiéndose observar ambos sueltos o unidos. La mayoría de astroцитos sueltos corresponden al tipo protoplásmico y fueron los predominantes en la lesión, y sobre todo en el trasplante con FCN (Lámina 11, figuras 2 y 4), mientras que los astroцитos acoplados coincidieron en el trasplante solo y con DMEM con el tipo fibroso (Lámina 11, figuras 1 y 3).

De acuerdo con Kimelberg *et al.*, (1990) y Sontheimer *et al.*, (1991), los astroцитos tienen la función de formar una red de células conectadas una a otra por uniones comunicantes. La difusión a través de estas uniones puede facilitar la redistribución de un exceso de K⁺ extracelular y mantener su homeostasis, un proceso al que se ha denominado amortiguamiento espacial; además, los astroцитos con prolongaciones largas promueven la migración de neuronas, mientras que los astroцитos con procesos cortos inhiben la motilidad neuronal (Hatten *et al.*, 1984 y Jaeger 1988). Por otra parte, los astroцитos no acoplados pueden realizar diferentes tareas y estar involucrados en funciones estructurales o regenerativas como las que se requieren después del daño en el tejido nervioso, es decir, los astroцитos no acoplados pueden representar una población de astroцитos reactivos que inclusive pueden formar un obstáculo para la regeneración axonal o ser neurotóxicos (Giulian, 1990), o bien pueden contrarrestar la acción neurotóxica de la microglía reactiva, liberando factores de crecimiento que mantengan la sobrevivencia y función neuronal (Giulian, 1993).

Tanto en la lesión como en el transplante con FCN encontramos sobre todo astrocitos sueltos (reactivos) (Lámina 12, esquema 2), ya que según Gage *et al.*, 1991, solamente los astrocitos reactivos secretan factores tróficos y trópicos, lo que sugiere su participación activa en los procesos regenerativos; lo que resulta sorprendente es la notable astrogliosis que forma una red (Lámina 12, esquema 1) en el transplante con vehículo. Se puede pensar que el DMEM al ser un medio de cultivo celular enriquecido pudo haber favorecido de manera especial el desarrollo y funcionalidad de los astrocitos y por lo tanto su participación en el amortiguamiento espacial. Sin embargo, también se observó un aumento significativo de tamaño en los astrocitos del transplante con vehículo (Tabla 4), esto quizás represente una alteración celular ya que según Kimelberg (1990) y Walz y Mujerji (1988), el hinchamiento extremo encontrado en astrocitos en estados patológicos y trauma es el resultado de su función homeostática, para el mantenimiento de una concentración extracelular constante de K^+ . Por otra parte, estos astrocitos liberan componentes citotóxicos (p.ej. glutamato) que pueden causar daño neuronal por una excesiva activación de receptores; esto concuerda también con nuestros resultados ya que este T+DMEM mostró significativamente la menor densidad neuronal por unidad de área (Tabla 3).

Los lotes en los que se observa significativamente mayor astrogliosis son el del transplante con FCN y sobre todo el del transplante con vehículo y coincidentemente son los que tienen una mayor población de microglía amiboide, la cual, según Giulian *et al.*, (1986, 1988a), produce tres factores de crecimiento astrocítico, entre ellos la interleucina-1, que causa incremento en el número de astrocitos y en la cantidad de proteína fibrilar ácida glial. Según Sher y Hu (1990), la proliferación astrocítica, el acúmulo de PFAG, el aumento en tamaño o en número de procesos es una reacción cerebral en respuesta a una variedad de insultos, lo que sugiere que los diferentes tipos de astrogliosis observada en los

transplantes representan una respuesta al daño que no pueden calificarse aún de más o menos favorable.

Oligodendrocitos

La dificultad para visualizar oligodendrocitos con prolongaciones dentro de los transplantes es congruente con el crecimiento de los tractos nerviosos y el desorden de las fibras observados en los transplantes, ya que según lo expresado por Schwab *et al.*, en 1990, la diferenciación oligodendrocítica y la formación de mielina ocurre siempre después de que ha terminado el crecimiento axonal, debido a que los oligodendrocitos maduros (Gal C+ con procesos radiales y anastomóticos) son fuertemente inhibitorios para el crecimiento de los axones además de tener una función de "guarda vía" para los tractos nerviosos adultos, de tal forma que la eliminación de los oligodendrocitos maduros produce un crecimiento desordenado de las fibras. Los oligodendrocitos observados en los transplantes quizás representen una población de oligodendrocitos inmaduros ya que como se mencionó, en todos los transplantes persiste el desarreglo de las fibras nerviosas y la escasez de tractos nerviosos definidos (Lámina 17, figuras 1 y 2). Sin embargo, en los transplantes con FCN, desde el punto de vista cualitativo, se observó un mayor arreglo de las fibras y tractos nerviosos (Lámina 17, figuras 3 y 4). El aumento significativo de oligodendrogliá en el T+FCN respecto a los otros transplantes posiblemente indique una mayor participación de estas células en el rearreglo de los tractos nerviosos. En todos los parámetros morfométricos se encontró un aumento significativo de los oligodendrocitos del cerebro lesionado respecto a los transplantes, lo cual se explica porque estas son células adultas del huésped que no tienen las mismas características morfológicas que las células inmaduras que al parecer son las que están presentes en los transplantes.

Por otra parte el mayor número de oligodendrocitos se encontró en el trasplante con FCN, coincidiendo con la disminución significativa de macrófagos en estos trasplantes respecto a TRANS y a T+DMEM. Esta relación inversamente proporcional entre oligodendrocitos y macrófagos ha sido sugerida por Sivron *et al*, en 1991.

Neuronas

En los trasplantes con FCN se encontró significativamente la mayor densidad neuronal por unidad de área (Lámina 16, figura 3). Lo anterior, aunado a la disminución significativa en todos los parámetros morfométricos medidos comparados con los otros trasplantes y su semejanza en estos mismos valores con las neuronas maduras de la lesión, parece indicar que en los trasplantes con FCN ha habido mayor proliferación de precursores neuronales y mayor diferenciación neuronal.

Mitosis

En todos los trasplantes se observó actividad mitótica (Lámina 14 y 15). En el trasplante con factor de crecimiento se observaron abundantes mitosis (un promedio de 7 en cada corte); una sexta parte se observó en el trasplante con vehículo y 1/38 parte en el trasplante solo. Este hecho, al parecer, sigue manteniendo cierta relación con la astrogliosis favorecida por la interleucina-1 producida por la microglía ameboide, ya que el aumento de interleucina-1 produce un aumento en la incorporación de timidina tritiada en cultivos de astrocitos como lo han demostrado Giulian *et al*, (1986, 1988b). Sin embargo, lo anterior no justifica la notable diferencia de mitosis observada en el trasplante con FCN;

quizás pudiera pensarse que el factor de crecimiento neuronal favorece la proliferación astrocítica lo cual es poco probable dado que las células blanco del FCN tiene gran especificidad química por él, y las células gliales, por ejemplo células de Schwann no compiten por él por tener pocos receptores (Alemán, 1991). También se podría pensar, que las mitosis observadas pertenecen en parte a neuronas, esto resulta extraño si consideramos que las células neuronales que están presentes en el trasplante son células postmitóticas que han perdido su capacidad para seguirse dividiendo una vez que han abandonado la zona germinal (Rakic, 1985; Eckenhoff y Rakic, 1988). Sin embargo, si consideramos las observaciones de Altman (1963, 1970) en el sentido de que hay producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto de rata, confirmadas por Bayer *et al.*, (1982) en el giro dentado y Kaplan y Hinds (1977), en el bulbo olfatorio; este hecho sería más factible en el tejido del trasplante, que por ser embrionario tiene una estructura más sencilla con un neuropilo menos denso que el adulto y neuronas jóvenes migratorias que pudieran ser células precursoras (Alvarez Buylla, 1991). Por otra parte, se ha inferido que células progenitoras multipotentes que pueden producir otras células multipotentes están presentes durante el desarrollo hasta antes del rápido aumento celular que acompaña a la neurogénesis cortical; aproximadamente E-16 en la rata (Frederiksen y McKay 1988; Rakic, 1988; Cameron y Rakic, 1991). Price y Thurlow (1988) han demostrado *in vivo* mediante el método de genes retrovirales en el cerebro de la rata, que en E-16 hay por lo menos dos tipos de células progenitoras, una que da origen a neuronas (piramidales y no piramidales) y otra que da origen a astrocitos y observadas hasta el día posnatal 14.

Por otra parte, los astrocitos tipo 1, semejantes morfológicamente a los astrocitos protoplásmicos de la sustancia gris (Cameron y Rakic, 1991), producen el factor de crecimiento fibroblástico (FCF) (Sensenbrenner *et al.*, 1990), que es

un potente factor de crecimiento neuronal y tiene efectos específicos sobre la división, diferenciación y sobrevivencia de las células nerviosas (Rohrer, 1990); esto coincide con la preponderancia de astrocitos protoplásmicos observada en los trasplantes con FCN y pudiera ser una explicación de la gran densidad neuronal y de las mitosis observadas en estos trasplantes.

El tamaño de las mitosis también es una fuerte sugerencia de que estas pertenecen a dos poblaciones celulares, probablemente astrocitos y neuronas. En el trasplante solo y en el trasplante con vehículo se observaron solamente mitosis pequeñas ($60 \mu\text{m}^2$ de área en promedio) (Lámina 14), mientras que en el trasplante con FCN se observaron $1/5$ parte de mitosis pequeñas y $4/5$ partes de mitosis grandes ($144.5 \mu\text{m}^2$ de área en promedio) (Lámina 15). También hay coincidencia en la proporción de mitosis pequeñas observadas en el trasplante con FCN y el número total de mitosis, también pequeñas, observadas en el trasplante con DMEM. Esto sugiere que las mitosis grandes pueden corresponder a precursores neuronales ya que difícilmente se pudiera pensar que correspondieran a macrófagos, tanto exógenos como endógenos, pues según los estudios de Konigsmark y Sidman, (1963), a los 14 días después de la lesión prácticamente no se encuentran macrófagos marcados con timidina tritiada.

Estudios *in vitro* sobre los efectos del FCN indican que éste no tiene acción como mitógeno (Rohrer, 1990), sin embargo *in situ* y en las condiciones microambientales de estos trasplantes, sobre todo en combinación con los factores tróficos producidos por la glía reactiva (según Rohrer, 1990), pudieran ser los responsables del efecto mitógeno observado.

Vascularización

La neovascularización es escasa en el trasplante y en el trasplante con

TRANSPLANTES

	PERÍMETRO μm	ÁREA μm^2	DIÁMETRO MAYOR μm	DIÁMETRO MENOR μm
TRANS	875.937	4,220,000	3,511.554	* 2,187.624
T+DMEM	8,005.636	4,220,000	3,082.449	* 1,852.293
T+FCN	9,178.933	5,460,000	3,513.235	1,778.382

TABLA 1. TAMAÑO DE TRANSPLANTES

VASOS

	PERÍMETRO μm	ÁREA μm^2	FORMA	DIÁMETRO EQUIVALENTE μm	DIÁMETRO MAYOR μm	DIÁMETRO MENOR μm	NÚMERO
TRANS	107.6188	781.0001	0.7145	28.3368	42.7562	23.1013	5.0001
T+DMEM	109.7088	1,007.5001	* * 0.7902	30.8554	42.4584	25.7937	10.3333
T+FCN	111.4361	903.9246	0.7331	29.0581	43.9602	23.2483	22.6667

TABLA 2. TAMAÑO Y NÚMERO DE VASOS

P<0.05, * respecto a LESIÓN * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

MICROGLÍA

	PERÍMETRO	ÁREA	FORMA	DIÁMETRO	DIÁMETRO	DIÁMETRO	NÚMERO
	μm	μm ²		EQUIVALENTE μm	MAYOR μm	MENOR μm	
TRANS	35.0064 *	54.7999 *	0.5846 *	8.2077 *	12.8501 *	7.2867 *	23.5001
T+DMEM	31.5661 *	48.1659 ***	0.6297 **	7.7735 *	12.0087 *	6.7141 *	19.5833
T+FCN	32.2606 *	53.7395 *	0.6613 *	8.2061 *	12.1078 *	7.1206 *	25.9167
LESIÓN	27.8543	40.5062	0.6683	7.1154	10.5651	6.1607	22.0001

TABLA 3. TAMAÑO Y NÚMERO DE MICROGLÍA

MACRÓFAGOS

	PERÍMETRO	ÁREA	FORMA	DIÁMETRO	DIÁMETRO	DIÁMETRO	NÚMERO
	μm	μm ²		EQUIVALENTE μm	MAYOR μm	MENOR μm	
TRANS	40.0521	115.5258	0.8671	11.8751	14.4515	10.5848	10.8333 *
T+DMEM	41.6979	126.7018	0.8785 *	12.4353	15.2914	11.0566	11.2501 *
T+FCN	40.7942	119.4928	0.8704	12.1126	14.9723	10.6114	6.7501 *
LESIÓN	41.1204	116.5855	0.8488	11.9216	14.9189	10.7231	19.5833

TABLA 4. TAMAÑO Y NÚMERO DE MACRÓFAGOS

ASTROCITOS

	PERÍMETRO	ÁREA	FORMA	DIÁMETRO	DIÁMETRO	DIÁMETRO	NÚMERO
	μm	μm ²		EQUIVALENTE μm	MAYOR μm	MENOR μm	
TRANSP	31.2857	56.5632	0.7307 *	8.4306 *	11.6999 *	7.2803 *	15.8330
T+DMEM	39.2024 *	70.1697 ***	0.5961 **	9.2425 *	13.6785 *	8.4201 *	19.0833 *
T+FCN	36.6679	63.8714	0.7237 *	8.8690	12.1315	7.8831	17.2501 *
LESIÓN	31.9144	57.6082	0.6715	8.2609	12.1866	7.0441	11.6667

TABLA 5. TAMAÑO Y NÚMERO DE ASTROCITOS

P<0.05, * respecto a LESIÓN, ** respecto a TRANS, *** respecto a T+FCN

OLIGODENDROCITOS

	PERÍMETRO μm	ÁREA μm^2	FORMA	DIÁMETRO EQUIVALENTE μm	DIÁMETRO MAYOR μm	DIÁMETRO MENOR μm	NÚMERO
TRANS	17.9762 *	20.7396 *	0.7932 *	5.0837 *	6.7849	4.4187 *	13.5833
T+DMEM	18.1359	21.0326 *	0.7946 *	5.1235 *	6.8901	4.4476 *	22.6667 *
T+FCN	18.1161 *	21.1506 *	0.8061 *	5.1622 *	6.8171	4.3983 *	24.5001 *
LESIÓN	18.7461	24.0001	0.8525	5.5034	6.8568	4.8964	15.3333

TABLA 6. TAMAÑO Y NÚMERO DE OLIGODENDROCITOS

NEURONAS

	PERÍMETRO μm	ÁREA μm^2	FORMA	DIÁMETRO EQUIVALENTE μm	DIÁMETRO MAYOR μm	DIÁMETRO MENOR μm	NÚMERO
TRANS	* 50.8619 *	* 177.5714 *	0.8473	* 14.8439 *	* 12.6136 *	* 12.9969 *	* 6.9167 *
T+DMEM	* 50.7850 *	* 179.4201 *	0.8526	* 14.9208 *	* 18.8341 *	* 13.1698 *	* 3.9667 *
T+FCN	42.4951	123.9004	0.6544	12.6081	15.5223	11.3918	11.5001 *
LESIÓN	42.2551	115.7917	0.8101	12.0651	15.4348	10.6648	2.7501

TABLA 7. TAMAÑO Y NÚMERO DE NEURONAS

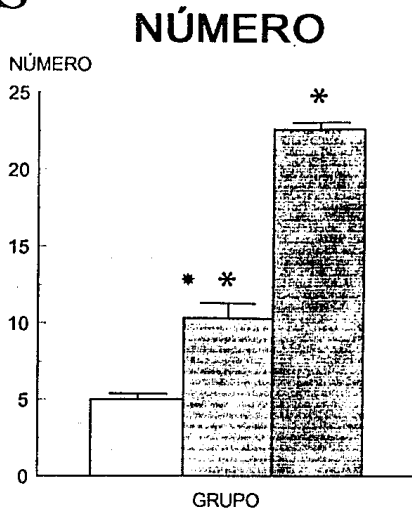
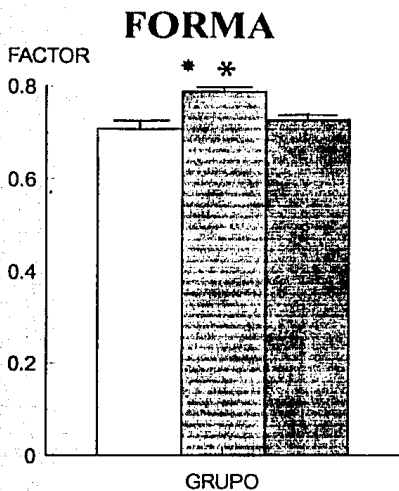
MITOSIS

	PERÍMETRO μm	ÁREA μm^2	FORMA	DIÁMETRO EQUIVALENTE μm	DIÁMETRO MAYOR μm	DIÁMETRO MENOR μm	NÚMERO
TRANS	24.5601	42.0001	0.8701	7.3001	9.3001	6.4901	1
T+DMEM	33.5301	* 77.8333 *	* 0.8633 *	* 9.8551 *	12.3551	* 8.6167 *	* 6 *
T+FCN	43.2021	144.5263	0.9155	13.1792	15.2303	12.1126	38

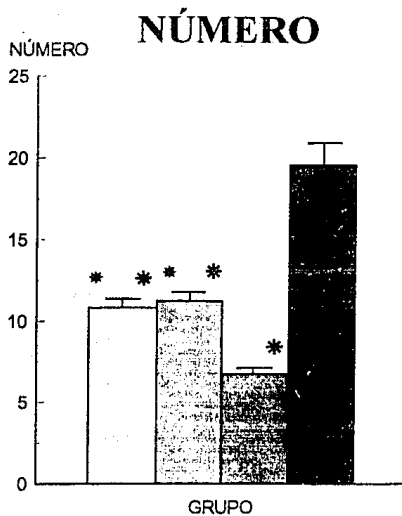
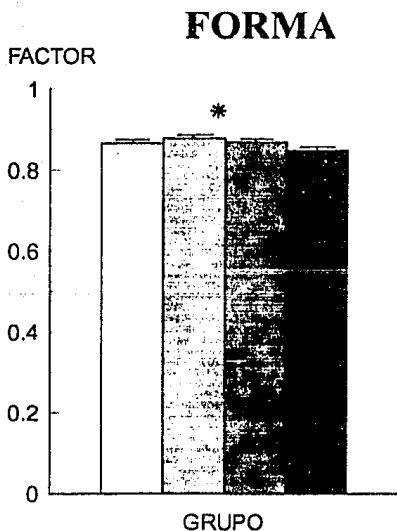
TABLA 8. TAMAÑO Y NÚMERO DE MITOSIS

P<0.05, * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

VASOS



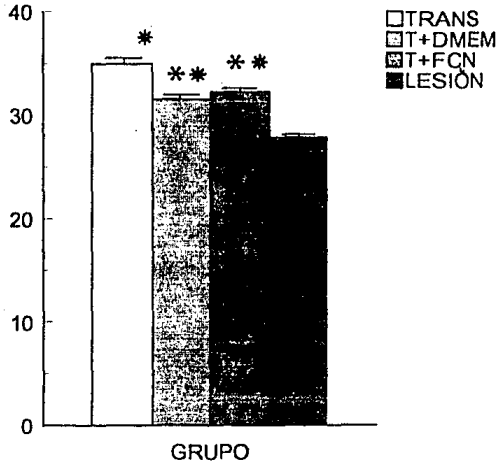
MACRÓFAGOS



GRÁFICA 1. FACTOR DE FORMA Y NÚMERO DE VASOS Y MACRÓFAGOS
 $P < 0.05$ * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

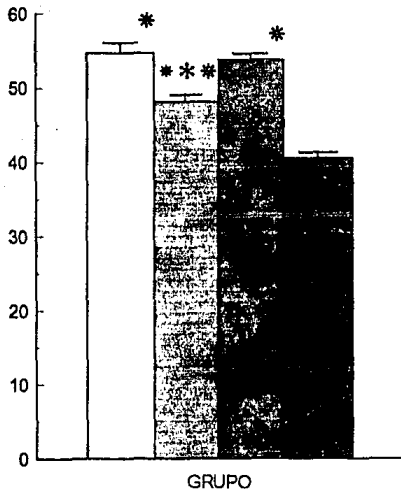
MICROGLÍA PERÍMETRO

MICRÓMETROS



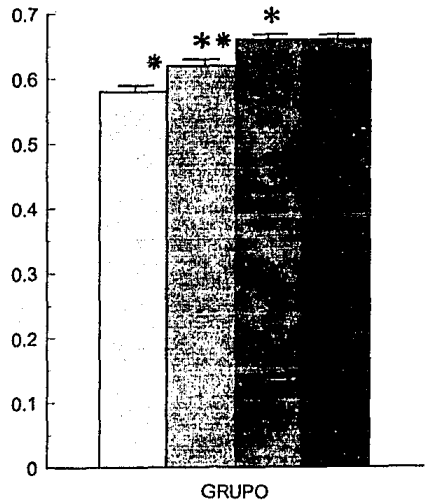
ÁREA

MICRÓMETROS



FORMA

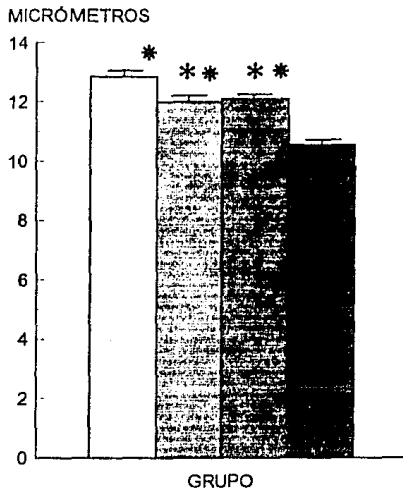
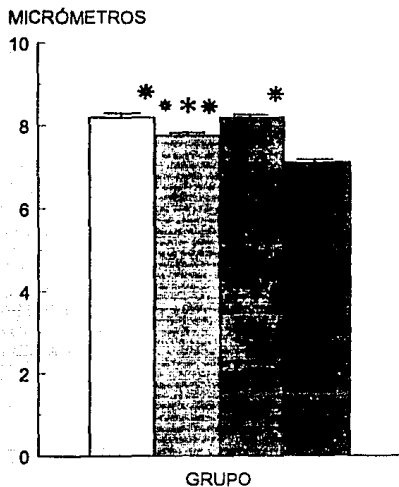
FACTOR



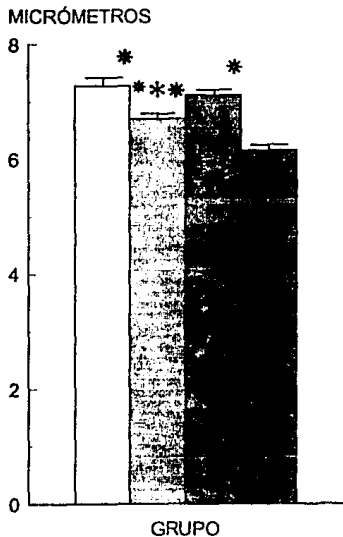
GRÁFICA 2. PERÍMETRO, ÁREA Y FACTOR DE FORMA DE MICROGLÍA
 $P < 0.05$ * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

MICROGLÍA

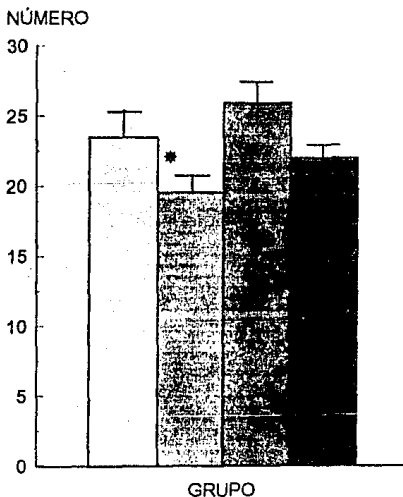
DIÁMETRO EQUIVALENTE DIÁMETRO MAYOR



DIÁMETRO MENOR

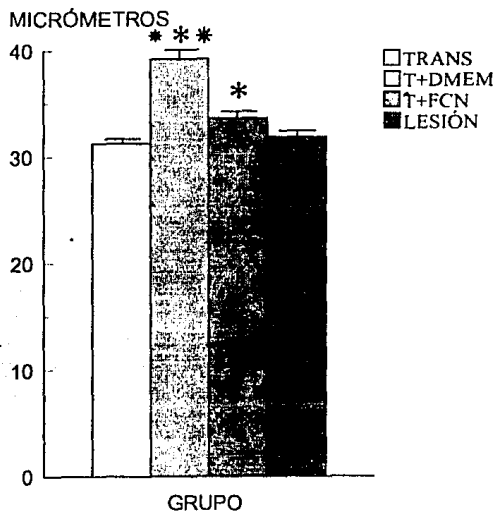


NÚMERO

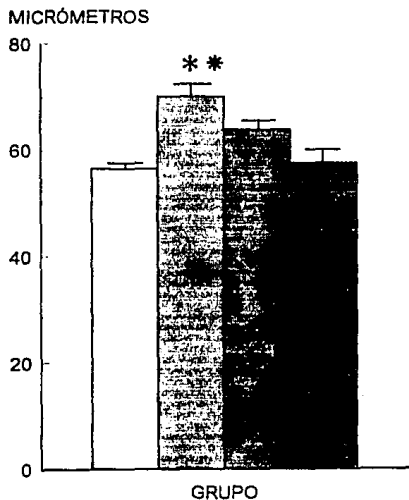


GRÁFICA 3. DIÁMETROS EQUIVALENTE, MAYOR, MENOR Y NÚMERO DE MICROGLÍA
 $P < 0.05$ * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

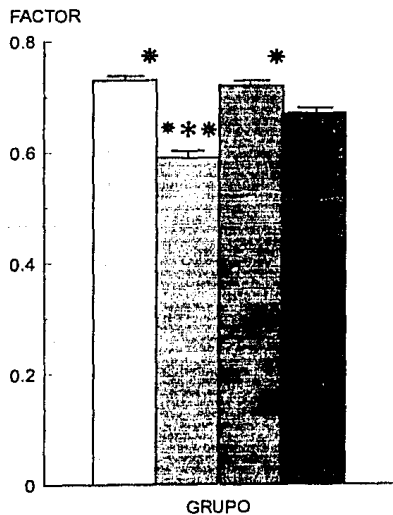
ASTROCITOS PERÍMETRO



ÁREA



FORMA

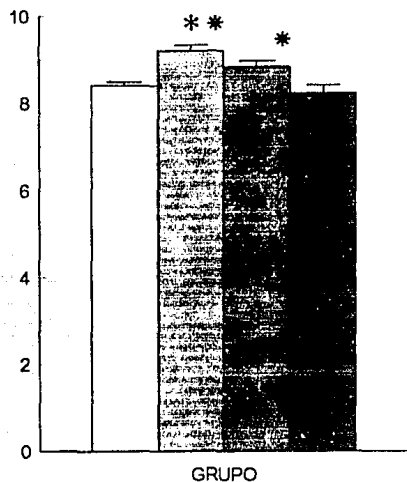


GRÁFICA 4. PERÍMETRO, ÁREA Y FACTOR DE FORMA DE ASTROCITOS
 $P < 0.05$ * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

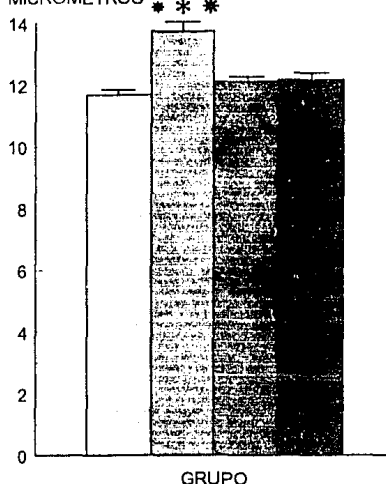
ASTROCITOS

DIÁMETRO EQUIVALENTE DIÁMETRO MAYOR

MICRÓMETROS

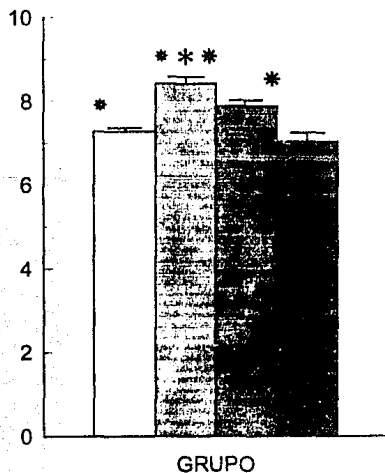


MICRÓMETROS



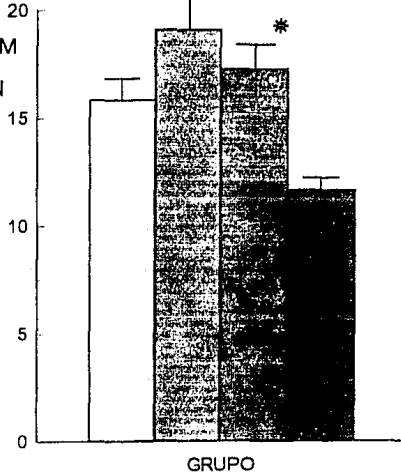
DIÁMETRO MENOR

MICRÓMETROS



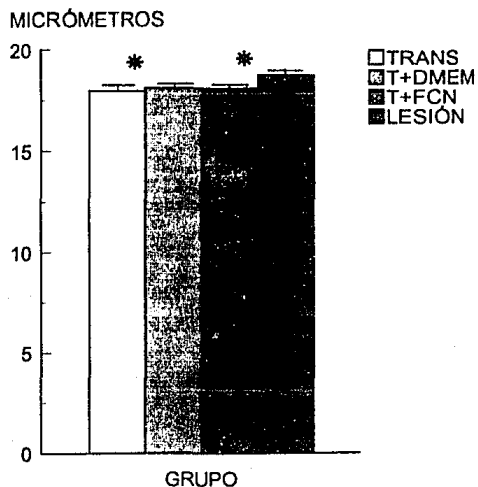
NÚMERO

NÚMERO

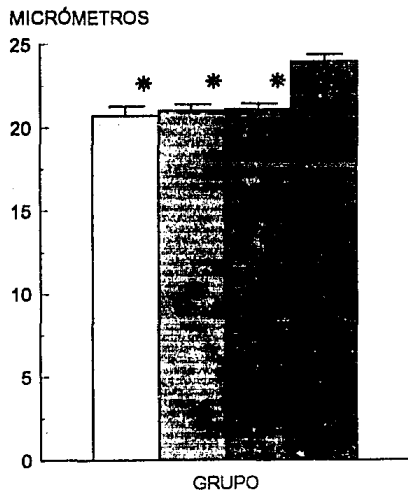


GRÁFICA 5. DIÁMETROS EQUIVALENTE, MAYOR, MENOR Y NÚMERO DE ASTROCITOS
 $P < 0.05$ * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

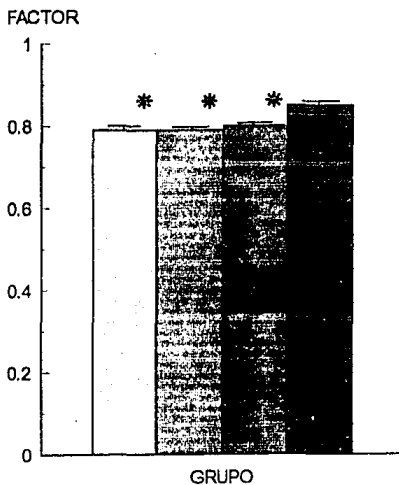
OLIGODENDROCITOS PERÍMETRO



ÁREA



FORMA

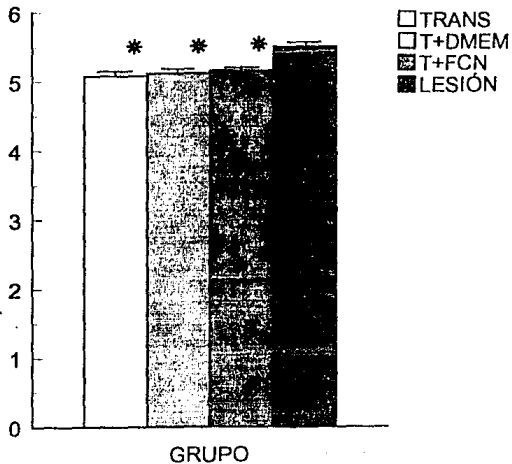


GRÁFICA 6. PERÍMETRO, ÁREA Y FORMA DE OLIGODENDROCITOS
P<0.05 * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

OLIGODENDROCITOS

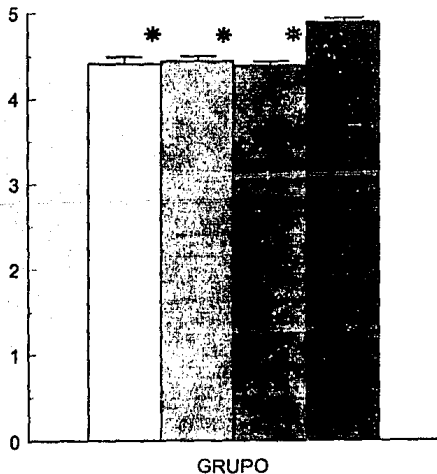
DIÁMETRO EQUIVALENTE

MICRÓMETROS



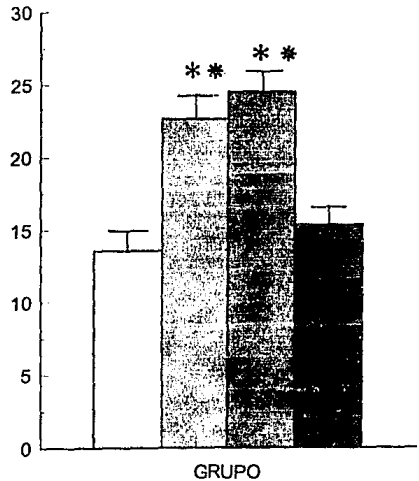
DIÁMETRO MENOR

MICRÓMETROS



NÚMERO

NÚMERO

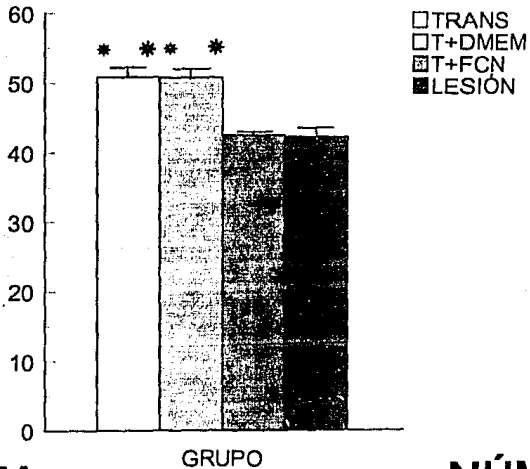


GRÁFICA 7. DIÁMETROS EQUIVALENTE, MENOR Y NÚMERO DE OLIGODENDROCITOS
P<0.05 * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

NEURONAS

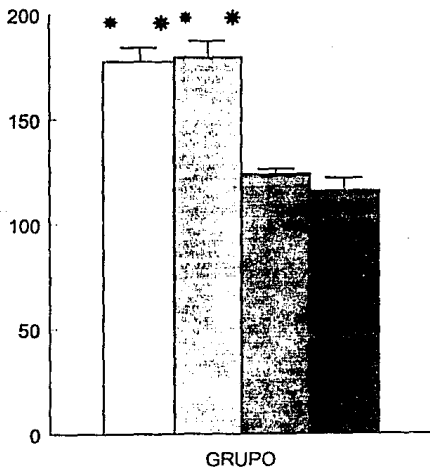
PERÍMETRO

MICRÓMETROS



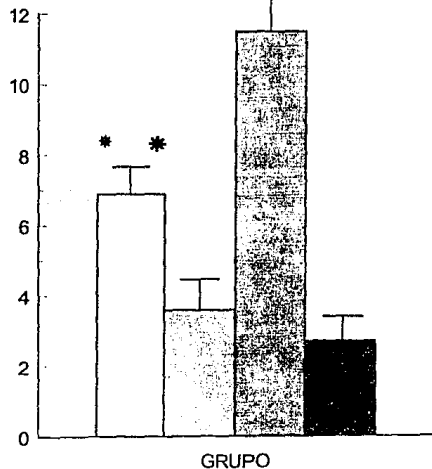
ÁREA

MICRÓMETROS



NÚMERO

NÚMERO

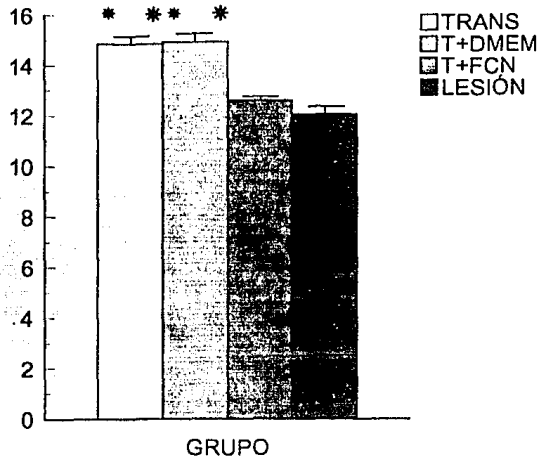


GRÁFICA 8. PERÍMETRO, ÁREA Y FACTOR DE FORMA DE NEURONAS
 $p < 0.05$ * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

NEURONAS

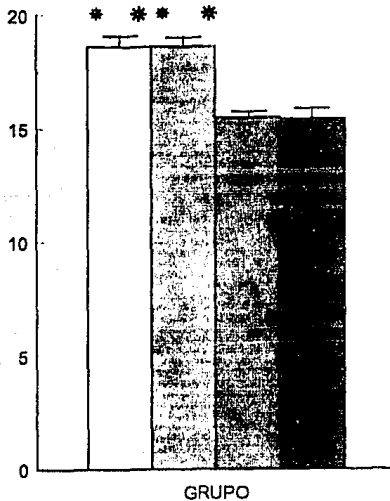
DIÁMETRO EQUIVALENTE

MICRÓMETROS



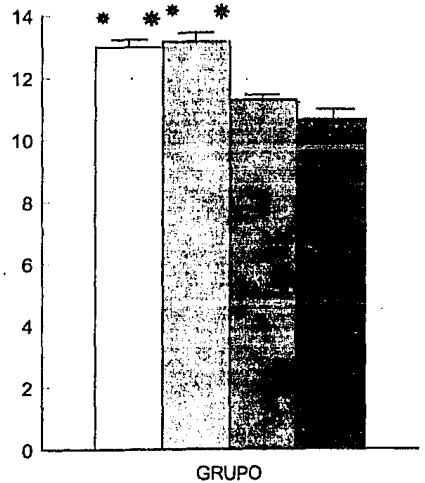
DIÁMETRO MAYOR

MICRÓMETROS



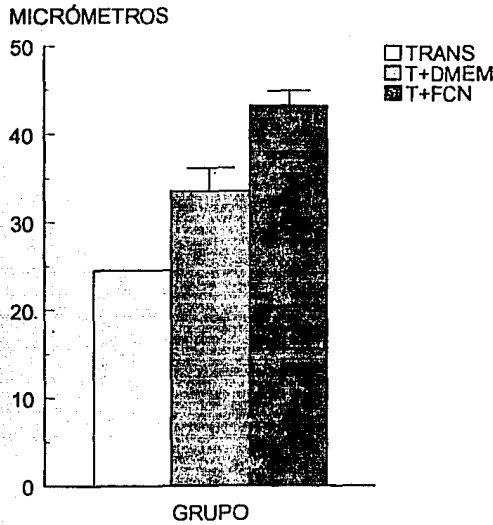
DIÁMETRO MENOR

MICRÓMETROS

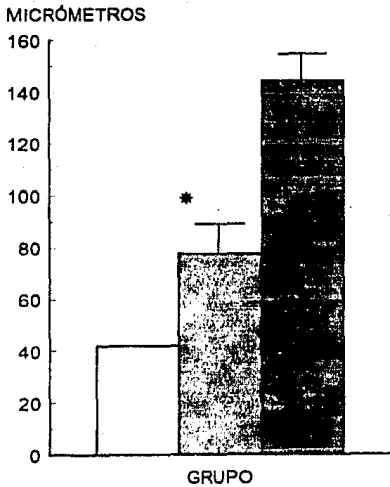


GRÁFICA 9. DIÁMETROS EQUIVALENTE, MAYOR, MENOR Y NÚMERO DE NEURONAS
 $P < 0.05$ * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

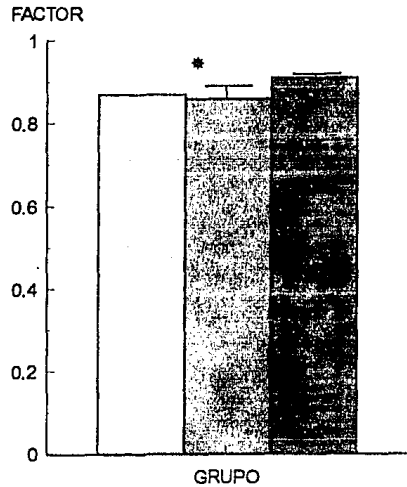
MITOSIS PERÍMETRO



ÁREA



FORMA

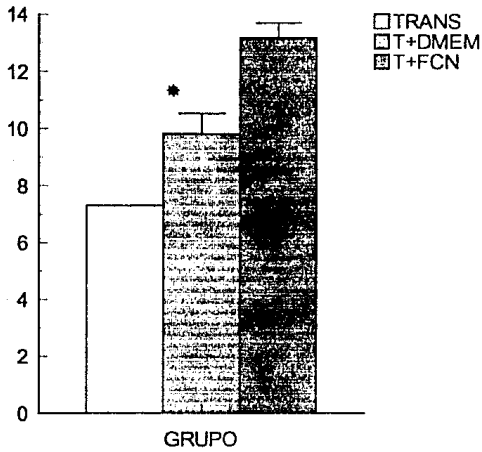


GRÁFICA 10. PERÍMETRO, ÁREA Y FACTOR DE FORMA DE MITOSIS
 $P < 0.05$ * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

MITOSIS

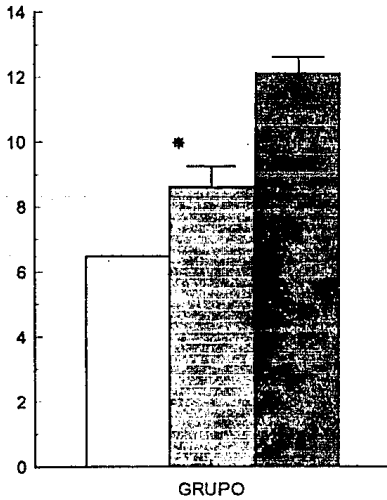
DIÁMETRO EQUIVALENTE

MICRÓMETROS



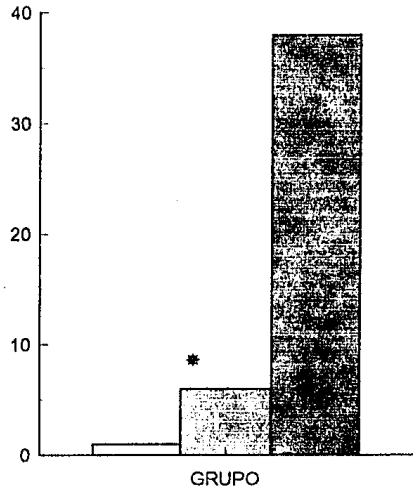
DIÁMETRO MENOR

MICRÓMETROS



NÚMERO

NÚMERO



GRÁFICA 11. DIÁMETROS EQUIVALENTE, MAYOR, MENOR, Y NÚMERO DE MITOSIS
 $P < 0.05$ * respecto a LESIÓN, * respecto a TRANS, * respecto a T+FCN

vehículo, sobre todo se da en las áreas de destrucción tisular (Lámina 4, figura 1), y los nuevos vasos, muy fibrosos aún, están rodeados de abundantes células inflamatorias. En el trasplante con FCN la neovascularización es muy notable (Lámina 4, figuras 2, 3 y 4), y no está relacionada con la necrosis tisular, pero sí coincide con el mayor número de microglía, sobre todo de tipo amiboide encontrada en estos trasplantes (Lámina 8, figura1). Según Giulian et al, 1990, después de una lesión, la secuencia de eventos que se suceden es como sigue: primero invasión de células inflamatorias, transformación de la microglía y pico de Interleucina-1 a los dos días; segundo, aparición de astrocitos reactivos por el día tres, y tercero, formación de nuevos vasos de 5 a 6 días. Se ha comprobado que la Interleucina-1 además de la astrogliosis produce neovascularización (Giulian, 1988b).

Estos eventos en situación normal redundan en destrucción tisular, entorpecimiento de la regeneración axonal y deterioro funcional; sin embargo, estas acciones pueden ser balanceadas por los factores de crecimiento liberados por los astrocitos en las fases tardías de la reparación del daño (Giulian, 1993) y quizás aumentado este efecto por la adición del FCN como se sugiere en el presente trabajo. De esta manera se mantendría la vitalidad neuronal y por lo tanto la recuperación de la función perdida por la destrucción de la corteza insular (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1991).

CONCLUSIONES

- 1. En la corteza insular, la reacción glial en el tejido lesionado es muy distinta a la de los trasplantes, probablemente debido a las diferencias entre el tejido adulto y el embrionario.**
- 2. La reacción glial entre los tres tipos de trasplantes homotópicos difiere**

considerablemente quizás en relación a su sensibilidad a los cambios en su microambiente en el TRANS, T+DMEM y T+FCN.

3. El FCN en combinación con las sustancias producidas por las células reactivas produce las siguientes particularidades en el transplante de corteza insular de 15 días:

a) La transformación microglial está más avanzada, predominando la microglía de tipo amiboide.

b) La astrogliosis es abundante, superada sólo por el T+DMEM, con la particularidad de que el astrocito predominante es el protoplásmico (reactivo).

c) Presenta el mayor número de oligodendrocitos.

d) Los macrófagos son escasos.

e) Hay una considerable neovascularización.

f) Existe un efecto mitogénico, probablemente de precursores neuronales.

4. La mayor astrogliosis se observó en el T+DMEM, con un notable predominio de astrocitos fibrosos, acoplados e hinchados.

5. En el transplante solo se observó claramente la transformación microglial, desde células ramificadas espinosas hasta macrófagos, por lo que el predominio de microglía amiboide en los trasplantes a los que se les adicionó DMEM y FCN, sugiere que estas sustancias (sobre todo el FCN), aceleraron esta transformación.

6. El FCN junto con las condiciones microambientales características de estos trasplantes, parecen compensar los efectos deletéreos micro y astrogliar, favoreciendo el crecimiento axonal, la diferenciación y sobrevivencia de las neuronas y quizás promoviendo la proliferación de sus precursores.

BIBLIOGRAFIA

1. Alemán A., V. 1991 El factor de crecimiento neuronal y el desarrollo del Sistema Nervioso. En: *Ontogenia Neural*. M. Salas (Ed). SMCF y UNAM, pp. 43-58.
2. Abott, J. and Raff, M. 1991. Glial-neuronal interaction (Preface). In: J. Abbot (Ed). *Glial-neuronal interaction*. The New York Academy of Sciences.
3. Aloisi, F. and Wekerle, H. 1990. Immune reactivity in the central nervous system: intercellular control of the expression of major histocompatibility antigens. In: Giulio Levi (Ed); *Differentiation and functions of glial cells*. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 371-378.
4. Altman, J. 1963. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.*, 145: 573-591.
5. Altman, J. 1970. Postnatal neurogenesis and the problem of neural plasticity. In: W. A. Himwich (Ed); *Developmental Neurobiology*. C:C: Thomas, Springfield, 1970.
6. Alvarez-Buylla, A. (1991) Neurogénesis en el cerebro adulto. En *Ontogenia Neural*. M. Salas (Ed). SMCF y UNAM. pp. 59-72
7. Ashwell, K. 1990. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res*. 55(2): 219-230.
8. Attwell, D., Barbour, B., Brew, H., Sarantis, M. and Szatkowski, M. 1991. Electrogenic glutamate uptake. Basic properties, modulation, and failure in anoxia. In: N.J. Abbott; *Glial-neuronal interaction*. The New York Academy of Sciences., pp. 610.
9. Avola, R., Condorelli, D., Ingrao, F., Magri, G., Carpano, P., Insirello, L., Costa, A., Reale, S., Ragusa, N. and Giuffrida. 1990. A. Effect of epidermal growth factor on nuclear and mitochondrial DNA, RNA and protein labeling in rat astroglial cells in primary culture. In: M. Bothwell; *Neuronal growth factors*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York., pp. 101-102.
10. Azmitia E., Bjorkland A. 1987. Cell and tissue transplantation into the adult brain. *Neurobiology of Aging* 8: 77-82.
11. Baghdassarian, D., Toru-Delbauaffe, D., Gavaret, J. and Pierre, M. 1993. Effects of transforming growth factor- β 1 on the extracellular matrix and cytoskeleton of cultured astrocytes. *Glia.*, 7(3): 193-202.
12. Banati, R., Gehrman, J. Schubert, P. and Kreutzberg, G. 1993. Cytotoxicity of microglia. *Glia.*, 7(1): 111-118.
13. Bansal, R., Gard, A., Warrington, A., Gonye, G., Avossa, D. and Pfeiffer, S. 1990. Oligodendrocyte progenitor development: reversible inhibition by a monoclonal antibody reacting with galactocerebroside and sulphatide. In: Giulio Levi (Ed); *Differentiation and functions of glial cells*. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 159-168.
14. Barres, B. 1991. Five electrophysiological properties of glial cells. In: N. J. Abbott; *Glial-neuronal interaction*. The New York Academy of Sciences.,pp. 248-254.
15. Barres, B., Chun, L. and Corey, D. 1988. Ion channel expression by white matter glia: I. Type-2 astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 1(1): 10-30.
16. Bayer, S., Yackel, J. and Puri, P. 1982. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile adult life. *Science*, 216: 890-892.
17. Benjamin, R. and Akert, K. 1959. Cortical and thalamic areas involved in taste

discrimination in the albino rat. *Journal of Comparative Neurology.*, 11: 231-259.

18. Bermúdez-Rattoni, F., Fernández J., Sánchez, M., Aguilar-Roblero, R. and Drucker-Colin, R. 1987. Fetal transplants induce recuperation of taste aversion learning. *Brain Res.*, 416: 147-152.

19. Bermúdez-Rattoni, F., Escobar, M. y Piña, A. 1991a. El condicionamiento aversivo a los sabores: un modelo del desarrollo anatomofuncional del gusto. En: *Ontogenia Neural*. M. Salas (Ed), SMCF y UNAM. pp. 249-260.

20. Bermúdez-Rattoni, F., Escobar, M., Piña, A., Tapia, R., López-García, J and Hiriart, M. 1991b. Effects of NGF on the recovery of conditioned taste aversion in the insular cortex lesioned rats. In: Richard L. Doty (Ed) *Chemical signals in vertebrate VI*. Plenum Press.

21. Bignami, A., Vanderhaeghen, J. Perides, G. and Dahl, D. 1990. Glial hyaluronate-binding protein: structural glycoprotein of brain extracellular matrix. In: Giulio Levi (Ed); *Differentiation and functions of glial cells*. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 169-177.

22. Boje, K. and Arora, P. 1992. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.*, 587(2): 250-256.

23. Bothwell, M. 1991. Preface. In: M. Botwell (Ed). *Neuronal growth factors*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

24. Bragin, A., Bohne, A. and Vinogradova, O. 1988. Transplants of the embryonal rat somatosensory neocortex in the barrel field of the adult rat: responses of the grafted neurons to sensory stimulation. *Neuroscience.*, 25(3): 751-758

25. Braun, J., Lasiter, M. P. and Kiefer, S. (1982) The gustatory neocortex of the rat. *Physiol. Psychol.* 10 (1): 13-45.

26. Bray, G., Villegas-Pérez, M., Vidal-Sanz, M., Carter, D. and Aguayo, A. 1991. Neuronal and nonneuronal influences on retinal ganglion cell survival, axonal regrowth, and connectivity after axotomy. In: N. J. Abbott; *Glial-neuronal interaction*. The New York Academy of Sciences., pp. 214-228.

27. Brightman, M. 1991. Implication of astroglia in the blood-brain barrier. In: N. J. Abbott; *Glial-neuronal interaction*. The New York Academy of Sciences., pp. 343-347.

28. Brightman, M. and Tao Cheng, J. 1990. Mutually imposed structural changes in plasma membranes of astroglial and brain endothelium. In: Giulio Levi (Ed). *Differentiation and functions of glial cells*. Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 107-115.

29. Brophy, P. 1991. Myelin and Demyelination. In: N. J. Abbott; *Glial-neuronal interaction*. The New York Academy of Sciences., pp. 205-208.

30. Bunge, R. 1991. Schwann cells in central regeneration. In: N.J. Abbott; *Glial-neuronal interaction*. The New York Academy of Sciences., pp. 229-233.

31. Cameron, S. and Rakic, P. 1991. Glial cells lineage in cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4: 124-137.

32. Canady, K., Ali-Osman, F. and Rubel, E. 1990. Extracellular potassium influences DNA and protein synthesis and glial fibrillary acidic protein expression in cultured glial cells. *Glia.*, 3(%) : 368-374.

33. Compston, D. and Scolding, N. 1991. Immune-mediated oligodendrocyte injury. In: N. J. Abbott; *Glial-neuronal interaction*. The New York Academy of Sciences., pp. 196-203.

34. Costero, I. 1929. Estudios sobre la explantación de tejido nervioso. Cultivo *in vitro* de

microglia. Bol. Soc. españ. Hist. Nat., 15: 350.

35. Costero, I. 1930. Studien an Mikrogliazellen (sogenannten Hortegazellen) in Gewebeskulturen von Gehirn. Arb. Staatsinst. exper. Therap., 23:27.

36. Costero, I. 1931. Experimenteller Nachweis der morphologischen und funktionellen Eigenschaften und des mesodermischen Charakters der Mikroglia. Zeitschr. ges. Neurol. und Psychiat., 132:371.

37. Costero, I. 1946. Tratado de Anatomía Patológica. Vol. I. Editorial Atlante, S.A. México. pp.150-153.

38. Cull-Candy, S. and Wyllie, J. 1991. Glutamate-receptor channels in mammalian glial cells. In: N. J. Abbott; Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences., pp. 458-474.

39. Chao, M. 1991. The membrane receptor for nerve growth factor. In: M. Bothwell (Ed); Neuronal growth factor. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York., 39-53.

40. Choi, B. 1990. Gliogenesis in the developing human fetal brain. In: Giulio Levi (Ed); Differentiation and function of glial cells. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 9-16.

41. Corkidi, G. 1989. Système d'analyse de préparations histologiques par imagerie numérique: Histo 2000. Application à l'étude physiopathologique de la maladie de Parkinson. Thèse de Doctorat. Université Paris, Val de Marne.

42. Das, G. 1990. Neural transplantation: an historical perspective. Neuroscience and Biobehavioral Reviews., 14: 389-401.

43. Davidson, A. 1991. Myelin structure and demyelination in multiple sclerosis. In: N. J. Abbott; Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences., pp. 174-177.

44. Davies, A. 1991. Nerve growth factor synthesis and nerve growth factor receptor expression in neural development. International Review of Cytology. 128: 109-137.

45. Del Río-Hortega P. 1919. El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia en estado normal. II. Intervención de la microglia en procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglia. Bol. Soc. Esp. Biol., 9: 69-120.

46. Del Río-Hortega, P. 1921. El tercer elemento de los centros nerviosos. Histogénesis y evolución normal; éxodo y distribución regional de la microglia. Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural. Tomo XI, Memoria 6ª.

47. Del Río-Hortega, P. 1932. Microglia. In: W. Penfield (Ed). Cytology and cellular pathology of the nervous system. Paul B. Hoebner Inc. New York., 2: 483-534.

48. Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnik, O. and Morgane, P. 1981. Nucleus raphe dorsalis: A morphometric Golgi study in rats of three age groups. Brain Res., 207: 1-16.

49. Díaz-Cintra, S. y Ortega, A. (1991) Histogénesis y Morfogénesis en el Sistema Nervioso Central. En: Ontogenia Neural. M. Salas (Ed). SMCF y UNAM. pp. 129-146.

50. Dutly, F. and Schwab, M. 1991. Neurons and astrocytes influence the development of purified O-2A progenitor cells. Glia., 4(6): 559-571.

51. Dutton, G. and Philibert, R. 1990. Taurine release from cultured astrocytes. In: Giulio Levi (Ed); Differentiation and functions of glial cells. Alan R. Liss, Inc, New York., pp. 235-241.

52. Eckenhoff, M, and Rakic, P. 1988. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of Rhesus monkey. J. Neurosci., 8: 2729-2747.

53. Escobar, M., Fernández, J., Guevara-Aguilar, R. and Bermúdez-Rattoni, F. 1989. Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion. *Brain Res.* 478: 368-374.
54. Estrada, E., Peralta, L. y Rivas, P. 1982. Manual de técnica histológica. AGT Editor, México.
55. Fanhestock, M. 1991. Structure and biosynthesis of nerve growth factor. In: M. Bothwell (Ed); *Neuronal growth factors*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York., pp. 1-26.
56. Fatatis, A. and Brennemam, D. 1990. Characterization of the Na⁺ Ca⁺ exchange in astrocytes. In: Giulio Levi (Ed); *Differentiation and functions of glial cells*. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 291-292.
57. Fernández-Ruiz, J., Escobar, M., Piña, A., Díaz-Cintra, S., Cintra, L. and Bermúdez-Rattoni. (1991) Time-dependent recovery of taste aversion learning by fetal brain transplants in gustatory neocortex-lesioned rats. *Behav. Neur. Biol.* 55: 179-193.
58. Floris, N. Densmore, T. Molleston, M. and Hickey, W. 1993. Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: Definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia.*, 7(1): 34-40.
59. Fonseca, M., DeFelipe, J. and Fairén, A. (1988) Local connections in transplanted and normal cerebral cortex of rats. *Exp. Brain Res.*, 69: 389-398.
60. Frederiksen, K. and McKay, R. 1988. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells *in vivo*. *J Neurosci.*, 8: 1144-1151.
61. Frei, K., Siepl, C., Groscurth, P. Bodemer, S. and Fontana, A. 1988. Immunology of microglial cells. *Ann N Y Acad Sci.*, 540: 218-227.
62. Frei, K., Siepl, C., Groscurth, P., Bodemer, S., Schwerdel, C. and Fontana, A. 1987. Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma treated microglia cells. *Eur J Immunol.*, 17: 1271-1278.
63. Fulton, B., Burne, J. and Raff, M. 1991. Glial cells in the rat optic nerve. The search for the type-2 astrocyte. In: N.J. Abbott; *Glial-neuronal interaction*. The New York Academy of Sciences. pp. 27-34.
64. Gage, F., Tuszynski, M., Chen, K., Fagan, A. and Higgins, G. 1991. Nerve growth factor function in the central nervous system. In: M. Bothwell (Ed); *Neuronal growth factors*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York., pp. 71-93.
65. Gallo, V., Usowicz, M. Cull Candy, S. and Levi G. 1990. Excitatory amino acid receptors and channels in cultured glial cells. In: Giulio Levi (Ed), *Differentiation and functions of glial cell*. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 253- 264.
66. Gard, A., Warrington, A. and Pfeiffer, S. 1988. Direct microculture enzyme-linked immunosorbent assay for studying neural cells: Oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 20: 46-53.
67. Giulian, D. 1990. Microglia and tissue damage in the central nervous system. In: *Differentiation and functions of glial cells*. Giulio Levi (Ed). pp. 379-389.
68. Giulian, D. 1993. Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia.*, 7(1): 102-110.
69. Giulian, D., Baker, F., Shih, L. and Lachman, L. 1986. Interleukin-1 of the central nervous system is produced by amoeboid microglia. *J. Exp. Med.*, 164: 594-604.

70. Giulian, D., Young, D. Woodward, J., Brown, D. and Lachman, L. 1988a. Interleukin-1 as an astroglial growth factor in the developing brain. *J. Neurosci.*, 8(2): 709-714.
71. Giulian, D., Woodward, J. Young, D. Krebs, J. and Lachman L. 1988b. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J. Neurosci.*, 8: 2484-2490.
72. Goldman, J.E. and Vaysse, P.J. 1990. Patterns of gliogenesis in different regions of the mammalian CNS. In: Giulio Levi (Ed); Differentiation and functions of glial cells. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 1-7.
73. Halegou, S., Armstrong, R. and Kremer, N. 1991. Dissectin the mode of action of a neuronal growth factor. In: M. Bothwell (Ed); Neuronal growth factor. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York., pp. 119-170.
74. Hansson, E. 1990. Interactions between neurotransmitter receptors/second messengers in astrocyte in primary culture. In: Giulio Levi (Ed); Differentiation and functions of glial cells. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 293-294.
75. Hatten, M., Liem, R. and Mason. 1984. Two form of cerebellar glial cells interact differently with neurons *in vitro*. *J. Cell Biol* 98: 193-204.
76. Hayashi, M., Yamashita, A. and Shimizu, K. 1990. Nerve growth factor in the primate central nervous system: regional distribution and ontogeny. *Neuroscience.*, 36 (3): 683-689.
77. Hirsh, E., Lejeune. O., Colliot, G., Corkidi, G. and Tajani, M. 1992. Computer methods in nuclei cartography. In (Eds); Methods in neurosciences. Academic Press, New York., pp. 62-77.
78. Höslí, L., Höslí, E., Heuss, L. and Rojas, J. 1990. Evidences for angiotensin and VIP receptors on astrocytes. In: Giulio Levi (Ed); Differentiation and functions of glial cells. Alan R. Liss, Inc. new York., pp. 297-298.
79. Hunter, K., Sporn, M. and Davies, A. 1993. Transforming growth factor-Bs inhibit mitogen-stimulated proliferation of astrocytes.
80. Infante, S. y Zárate, G. 1988. Métodos estadísticos. Un enfoque interdisciplinario. Editorial Trillas. México.
81. Jacque, C., Suard, I., Collins, V. and Raoul, M. 1986. Interspecies identification of astrocytes after intracerebral transplantation. *Dev. Neurosci.*, 8: 142-149.
82. Jaeger, Ch. 1988. Plasticity of astroglia: evidence supporting process elongation by "stretch". *Glia.*, 1(1): 31-38
83. Jaeger, C. and Lund, R. 1981. Transplantation of embrionic occipital cortex to the brain of newborn rats: a Golgi study of mature and developing transplants. *The Journal of Comparative Neurology.*, 200: 213-230.
84. Kajiwara, K., Hirozane, A., Fukumoto, T., Orita, T., Nishizaki, T., Kamiryo, T. and Ito, H. 1991. Major histocompatibility complex expression in brain of rats with graft-versus-host disease. *J. Neuroimmunol.*, 32(3): 191-198.
85. Kaplan, M. and Hinds, J. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science.*, 197: 1092-1094.
86. Kettenmann, H., Banati, R. and Wallz, W. 1993. Electrophysiological behavior of microglia. *Glia.*, 7(1): 93-101.
87. Kettenmann, H, Blankenfeld, V. and Trotter, J. 1991. Physiological properties of

- oligodendrocytes during development. In: N.J. Abbott; Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences., pp. 64-77.
88. Kimble, D. 1988. Functional aspects of neuronal transplantation in the mammalian CNS. *Neurobiology of Aging.*, 9: 317-3
89. Kimelberg, H., Neary, T., Ducis, I. and Norenberg, L. 1990. Volumen changes of astrocytes *in vitro* as a model for pathological astrocytic swelling. In: Giulio Levi (Ed); Differentiation and functions of glial cells. Alan R. Liss, INC. New York., pp. 335-348.
90. Königsmark, B. and Sidman, R. 1963. Origin of brain macrophages in the mouse. *J. Neuropathol.* 22: 643-676.
91. Kuffler, S. and Nichols, J. 1966. The physiology of neuroglial cells. *Ergebn Physiol.*, 57: 1-90.
92. Laywell, E. and Steindler, D. 1991. Boundaries and wound, glia and glycoconjugates. Cellular and molecular analysis of developmental partitions and adult brain lesions. In: N. J. Abbott; Glial -neuronal interaction. The New York Academy of Sciences., pp. 122-141.
93. Lawson, L., Perry, V., Dri, P. and Gordon, S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.*, 39(1): 151-170.
94. Levi, G., Aloisi, F. and Agresti, C. 1990. Cellular interactions promoting the oligodendroglial differentiation of bipotential glial precursors in culture. In: Giulio Levi (Ed); Differentiation and function of glial cells. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 25-35.
95. Lim, R. 1990. The identity of glia maturation factor. In: M. Bothwell; Neuronal growth factors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. pp. 71-78.
96. Ludwin, S. 1990. Oligodendrocyte-axon interactions and the implications for remyelination. In: Giulio Levi (Ed), Differentiation and functions of glial cells. Alan R. Liss, Inc, New York., pp. 361-369.
97. Manthorpe, M., Muir, D. Hagg, T., Engvall, E. and Varon, S. 1990. Glial cell laminin and neurite outgrowth. In: Giulio Levi (Ed), Differentiation and functions of glial cells. Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 135-148.
98. Maxwell, D. and Kruger. 1965. Small blood vessels and the origin of phagocytes in the rat cerebral cortex following heavy particle irradiation. *Experimental Neurology.*, 12: 33-54.
99. McKinnon, R., Smith, C., Behar, T., Smith, T. and Dubois- Dalck, M. 1993. Distinct effects of bFGF and PDGF on oligodendrocyte progenitor cells. *Glia* 7(3):
100. Meshul, Ch., Seil, F. and Herndon R. 1987. Astrocytes play a role in regulation of synaptic density. *Brain Research.* 402: 139-145.
101. Minturn, J., Black, J., Angelides, K. and Waxman, S. 1990. Sodium channel expression detected with antibody 7493 in A2B5+ and A2B5- astrocytes from rat optic nerve *in vitro*. *Glia.*, 3(5): 358-367.
102. Mori, S. and Leblond, C. 1969. Identification of microglia in light and electron microscopy. *J. Comp. Neur.*, 135: 57-80.
103. Müller, C. and Best, J. 1988. Ocular dominance plasticity in adult cat visual cortex after transplantation of cultured astrocytes. *Nature.*, 342: 427-430.
104. Nagy, Z. and Martínez, K. 1991. Astrocytic induction of endothelial tight junction. In: N.J. Abbott. Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences. pp. 395-404.

105. Noble, M., Ataliotis, P., Barnet, S., Bevan, C., Bögl, O., Groves, A., Jat, P., Wolszijk, G. and Wren, D. 1991. Development, regeneration, and neoplasia of glial cells in the central nervous system. In: N.J. Abbott; Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences. pp. 35-47.
106. Patel, A., Hunt, A., Gray, C., Kiss, J. and Sanfeliu, C. 1990. Neurotrophic factors produced by astrocytes influencing the development and normal function of cholinergic neurons. In: M. Bothwell (Ed); Neuronal growth factors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York., pp. 123-134.
107. Pearce, B. 1991. Glia as targets for neuroactive substances. In: N.J. Abbott; Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences., pp. 432-433.
108. Perry, V., Crocker, P. and Gordon, S. 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience.*, 15: 313-326.
109. Pierre, M., Pomerance, M., Gavaret, J. and Toru-Delbauffé, D. 1990. Growth factors, cancer promoters, and cAMP activate a ribosome specific protein kinase (S6 kinase) in astroglial cells. In: M. Bothwell; Neuronal growth factors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York., pp. 105-106.
110. Price, J. and Thurlow, L. 1988. Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development.*, 104: 473-482.
111. Prochiantz, A., Chamak, B and Rousset, A. 1990. The *in vitro* regulation of neuronal morphogenesis and polarity. In: Giulio Levi (Ed); Differentiation and functions of glial cells. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 117-121.
112. Rakic, P. 1985. Limits of neurogenesis in primates. *Science.*, 227: 1054-1056
113. Rakic, P. 1988. Specification of cerebral cortical areas. *Science.*, 241: 170-176.
114. Rakic, P. 1991. Glial cells in development. *In vivo* and *in vitro* approaches. In: N.J. Abbott; Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences., pp. 96-99.
115. Raisman, G. 1991. Glial, neurons and plasticity. In: N. J. Abbott; Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences., pp. 209-213.
116. Regan, C. 1988. Neuronal and glial markers of the central nervous system. *Experientia* 44: 695-697.
117. Reichenback, A. 1991. Glial K⁺ permeability and CNS K⁺ clearance by diffusion and spatial buffering. In: N. J. Abbott. Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences. pp. 272-286.
118. Richardson, A., Hao, C. and Fedoroff, S. 1993. Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia.*, 7(1): 25-33.
119. Ritchie, M. 1991. Current perspective in glial electrophysiology. In: N.J. Abbott. Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences. pp. 331-342.
120. Risau, W. 1991. Induction of blood-brain barrier endothelial cell differentiation. In: N.J. Abbott. Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences. pp. 405-419.
121. Rohrer, H. 1990. The role of the growth factors in the control of neurogenesis. *Eurp. J. Neurosci.* 2: 1005-1015.
122. Rumsby, M., Murphy, J., Sayner, R., McNulty, and Suckling, A. 1990. Protein kinase C in primary glial cell cultures and subcultures: 80kDA protein phosphorylation, the effect of platelet-derived growth factor and the turnover of phosphatidylcholine. In:

- Giulio Levi; Differentiation and function of glial cells. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 87-99
123. Salm, A., Lerea, L., Castros, H. and McCarthy, K. 1990. Distinct subsets of astroglia can be defined by their expression of neuroligand receptors that regulate intracellular calcium levels. In: Giulio Levi (Ed). Differentiation and functions of glial cells. Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 275-288.
124. Sarnat, H. y Netsky, M. 1976. Evolución del sistema nervioso. Ed. H. Blume. España.
125. Schachner, M. 1991. Cell surface recognition and neuron-glia interactions. In: N. J. Abbott. Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences., pp. 105-112.
126. Schwab, M., Schnell, I. and Bandtlow, E. 1990. Expression of inhibitory substrates: a new role for oligodendrocytes. In: Giulio Levi (Ed); Differentiation and functions of glial cells. Alan R. Liss, Inc., pp. 181-187.
127. Sensenbrenner, M., Korr, H., Siewert, F., Perraud, F. and Labourdette, G. 1990. GFAP-positive astroglial cells are stimulated by bFGF to reenter the cell cycle. In: Giulio Levi (Ed); Differentiation and function of glial cells. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 79-86.
128. Sher, P and Hu, S. 1990. Increased glutamate uptake and glutamine synthetase activity in neuronal cells cultures surviving chronic hypoxia. *Glia* 3: 350-357.
129. Sivron, T., Cohen, A., Hirschberg, D., Jeserich, G. and Schwartz, M. 1991. Soluble factor(s) produced in injured fish optic nerve regulate the postinjury number of oligodendrocytes: Possible role of macrophages. *Glia* 4: 591-601.
130. Skoff, R. and Knapp, P. 1991. Lineage and differentiation of oligodendrocyte in the brain. In: N.J. Abbott; Glial neuronal interaction. The New York Academy of Sciences., pp. 48-55.
131. Sontheimer, H., Minturn, J. Ransom, B., Black, J., Cornell-Bell, A. and Waxman, S.G. (1991) Cell coupling is restricted to subpopulations of astrocytes cultured from rat hippocampus and optic nerve. In: Glial-Neuronal Interaction. Abott N.J. (Ed). pp. 592-596.
132. Stitt, T., Grasser, E. and Hatten, M.1991. Molecular mechanism of glial-guided neuronal migration. In: N.J. Abbott; Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences., pp. 113-121.
133. Theele, D. and Streit, W. 1993. A chronicle of microglia ontogeny. *Glia.*, 7(1): 5-8.
134. Van der Zee, E., Jong, G., Strosberg, A. and Luiten, P. 1993. Muscarinic acetylcholine receptor-expression in astrocytes in the cortex of young and aged rats. *Glia.*, 8(1): 42-50.
135. Vibulsreth, S., Hefli, F., Ginsberg, M., Dietrich, W. and Busto, R. 1987. Astrocytes protect cultured neurons from degeneration induced by anoxia. *Brain Res.*, 422: 303-311.
136. Von Blankenfeld, G., Ranson, B. and Kettenman, H. 1993. Development of cell-cell coupling among cells of the oligodendrocytes lineage. *Glia* 7(4): 322-328.
137. Walz, W. and Mukerji, S. 1988. KCl movements during potassium induced cytotoxic swelling of cultured astrocytes. *Exp Neurol.*, 99: 17-29.
138. Wilkin, G., Marriott, D., Cholewinski, A., Wood, J., Taylor, G., Stephens, G. and Djamgoz, M. 1991. Receptor activation and biochemical consequences in astrocytes. In: N. J. Abbott; Glial-neuronal interaction. The New York Academy of Sciences., pp. 475-

488.

139. Wilkin, G., Reid, J., Marriot, D. and Cholewinski, J. 1990. Peptide receptors on astrocytes: characterization and regional heterogeneity. In: Giulio Levi (Ed); Differentiation and functions of glial cells. Alan R. Liss, Inc. New York., pp. 265-274.

140. Yamamoto, T. and Kawamura, Y. 1972. Summated cerebral responses to taste stimuli in rat. *Physiology and Behavior.*, 9: 789-793.