

3081 11  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO.

---

**EFFECTOS DE LOS TRANSPLANTES DE TEJIDO NERVIOSO  
FETAL SOBRE LA RECUPERACION CONDUCTUAL**

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

PRESENTA

**ANA LUISA PINA HERNANDEZ**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

RESUMEN.....	1
ORGANIZACION.....	3
INTRODUCCION	
TRABAJO I. Plasticidad Neuronal. Recuperación funcional despues de lesiones cerebrales.....	5
Transplantes de tejido cerebral fetal.....	33
PROPOSITOS DE ESTA TESIS.....	40
TRANSPLANTES ESTRIATALES	
TRABAJO II Differential recovery of inhibitory avoidance learning by striatal, cortical and mesencephalic fetal grafts.....	42
TRABAJO III Grafted-induced recovery of inhibitory avoidance conditioning in striatal lesioned rats is related with choline acetyltransferase activity.....	61
TRABAJO IV El papel del factor de crecimiento neuronal en la recuperación de la prevención pasiva en ratas con lesiones estriatales.....	78
CONCLUSIONES REFERENTES A LOS TRANSPLANTES ESTRIATALES.....	89
TRANSPLANTES CORTICALES	
TRABAJO V Time-dependent recovery of taste aversion learning by fetal brain transplants in gustatory neocortex-lesioned rats.....	94
TRABAJO VI Effects of nerve growth factor on the reeccovery of condition taste aversion in the insular cortex lesioned rats.....	111
CONCLUSIONES REFERENTES A LOS TRANSPLANTES CORTICALES.....	119

TRANSPLANTES HIPOTALAMICOS

TRABAJO VII

Fetal brain transplants induce recovery of male sexual behavior in medial preoptic area-lesioned rats.....123

TRABAJO VIII

Hypothalamic but not cortical grafts induce recovery of sexual behavior and conectivity in medial preoptic area-lesioned rats...130

CONCLUSIONES REFERENTES DE LOS TRANSPLANTES HIPOTALAMICOS.....136

CONCLUSIONES GENERALES.....139

REFERENCIAS.....146



## ORGANIZACION

Esta tesis esta constituida de la siguiente manera: en primer termino se presenta una introduccion en la que se abordan conceptos generales sobre la plasticidad neuronal y la recuperacion funcional despues de lesiones cerebrales (Trabajo I) y sobre transplantes de tejido nervioso. Posteriormente se incluyen los trabajos referentes a los transplantes estriatales (Trabajos II, III, IV), en seguida los relacionados con corteza insular (Trabajos V y VI) y los relacionados con transplantes hipotalamicos (Trabajos VII y VIII). Cada una de estas tres secciones incluye una conclusion particular de cada tema. Finalmente, las Conclusiones Generales constituyen la ultima parte de la presente tesis.

# INTRODUCCION

**TRABAJO I**

**PLASTICIDAD CEREBRAL. RECUPERACION  
FUNCIONAL DESPUES DE LESIONES  
CEREBRALES**

## **RESUMEN**

Se describen diversos aspectos de la plasticidad neuronal en el contexto de la recuperación funcional después de una lesión. En particular se mencionan las teorías y los mecanismos neuronales propuestos para explicar el restablecimiento de una función, y de los factores que influyen en este proceso, así como algunos de los ensayos terapéuticos realizados en este campo.

## **ABSTRACT**

This paper describes various aspects of neuronal plasticity in the context of functional recovery after brain lesions. In particular, this review deals with the theories and mechanisms proposed to participate in functional recovery, and with those factors that pertain to this phenomenon. Finally, therapeutical procedures used in this field are reviewed.

## **PLASTICIDAD CEREBRAL. RECUPERACION FUNCIONAL DESPUES DE LESIONES CEREBRALES**

El cerebro es una materia compleja, y maravillosa. Cuando pensamos en él (materia que se piensa a sí misma), nos podemos imaginar sus múltiples funciones. Desde las aparentemente más sencillas, como el caminar, el sentir, o el ver, hasta las más complejas, como el lenguaje, la memoria o la capacidad de expresarse por medio de la música.

El asombro que experimentamos ante esta forma de organización es sólo comparable con la perplejidad y la impotencia que producen sus deficiencias. Sean producidas en el nacimiento o en cualquier etapa de la vida, las lesiones nerviosas son de efectos catastróficos para el individuo y su entorno. Las secuelas de un accidente cerebral ilustran, de manera trágica, la fragilidad de esta materia.

Igual asombro nos produce el constatar la recuperación funcional, como la observada en los niños que vuelven a hablar a pesar de haber sufrido una lesión cerebral importante. ¿Qué sucede en estos casos? ¿Por qué algunos individuos se recuperan mejor que otros ante una misma lesión cerebral? ¿Qué ocurre durante el proceso de aprendizaje que nos permite aprovechar nuestras experiencias e idear nuevos comportamientos?

Estas capacidades funcionales son el sustrato de la plasticidad nerviosa. La "moldeabilidad" que caracteriza al sistema nervioso se manifiesta constantemente, variando de acuerdo con múltiples factores. ¿En qué difieren los distintos tipos de plasticidad? ¿Cuáles son los mecanismos involucrados en cada uno de ellos? ¿En qué medida nos puede ayudar entender mejor estos mecanismos?

Nuestro objetivo en este trabajo es dar al lector elementos de análisis sobre la plasticidad relacionada con los accidentes neurológicos. Pensamos que los mecanismos involucrados en esta plasticidad se manifiestan en varios niveles de organización biológica, y que por lo mismo, pueden ser sujetos de estudio de diversas disciplinas, no sólo de la medicina, de la biología y de la psicología, sino también de la filosofía.

## PLASTICIDAD Y RECUPERACION FUNCIONAL

En los últimos años, el concepto de plasticidad del sistema nervioso ha cobrado importancia debido a sus implicaciones teórico prácticas (Illis, 1976; Lund, 1978; Stein y col, 1983; Freed y col, 1985; Dunnett y Bjorklund, 1987).

En general, si un organismo tiene la capacidad de modificar su comportamiento, o si se observa recuperación de una función perdida o alterada se dice que el sujeto muestra plasticidad. Sin embargo, este concepto tiene distintas connotaciones dependiendo de los contextos en los que ha sido definido. Así, en el estudio de la plasticidad sináptica, puede entenderse como "los cambios a largo plazo en la potencialidad sináptica, como resultado de cambios transcendentales en la actividad sináptica" (Konorski, 1948; Bliss, 1979), y en el caso de la plasticidad del comportamiento, se puede decir "que es un cambio significativo de la conducta" (James, 1890). Debido a la confusión que despierta el empleo indiscriminado del término, se ha sugerido que no debe designarse plasticidad a las respuestas benéficas o adaptativas después de una lesión (Geschwind, 1974). Creemos, sin embargo, que la confusión reside en que este término no se define en el contexto en el que se trabaja, aun partiendo de la semántica implícita en el término plasticidad (moldeable, cambiante).

Aquí definiremos a la plasticidad como un proceso caracterizado por cambios adaptativos estructurales y funcionales del sistema nervioso, que se efectúan como consecuencia de la alteración de su ontogenia (historia de la vida de un individuo, tanto embrionaria como posnatal).

Existe mucha literatura acerca de la recuperación funcional, sin embargo, el término no está bien definido. Veamos algunos ejemplos. Jennett y Bond (1975), definen como una "buena recuperación" a la «rehabilitación a la vida normal, aunque puede haber deficiencias neurológicas y psicológicas menores». Esta definición, aunque útil para registros legales e institucionales, ofrece una guía pobre en la investigación sobre la relación cerebro-comportamiento. Laurence y Stein (1978), definen la recuperación funcional como «el retorno a los niveles normales o cercanos a la normalidad de un tipo

de ejecución después de los efectos sufridos por una lesión en el sistema nervioso"; sin embargo, no indican criterios para decidir qué es lo "cercano a la normalidad". Marshall (1985) sugiere que la recuperación debiera referirse "a los impedimentos en funciones fisiológicas o de comportamiento que son superados después de transcurrido tiempo de realizada la lesión inicial".

Para el propósito de este artículo definiremos a la recuperación funcional como la tendencia a un estado similar al anterior a una lesión, que se manifiesta por la ejecución de las actividades realizadas por un organismo después de la lesión neural, independientemente de los mecanismos conductual, bioquímico y electrofisiológico subyacentes.

## **TEORIAS SOBRE LA RECUPERACION FUNCIONAL**

Las lesiones al sistema nervioso, son causa frecuente de disfunciones más o menos severas, algunas de las cuales, con el tiempo, pueden restablecerse parcial o totalmente.

Los conceptos y las teorías establecidos para explicar la capacidad del sistema nervioso para restablecer sus funciones, reflejan la evolución del conocimiento sobre la morfología del sistema nervioso, el desarrollo de nuevas tecnologías para su estudio y las idiosincrasias social, política y cultural de la época.

La frenología (teoría que propone la localización de las distintas funciones en áreas específicas del cerebro) fue la primera teoría sobre el funcionamiento cerebral, y dominó el ambiente científico del siglo pasado. Esta teoría fue el resultado de los estudios anatómicos de Gall (1758-1828), así como de las observaciones clínicas de Broca y Wernicke, en pacientes con afasias motoras y sensoriales, respectivamente. De la controversia entre localizacionistas y antilocalizacionistas (o globalistas) surgieron varias teorías sobre la recuperación funcional, entre las que destacan las siguientes:

### **Teoría de acción de masas o de equipotencialidad.**

Esta teoría globalista, propuesta en Francia por Flourens (1794-1867), en Alemania por Goltz (1876-1884), y desarrollada por Lashley (1929), postula que el cerebro, o mejor dicho la corteza cerebral, funciona como un todo



indiferenciado en el que la pérdida y el grado de permanencia temporal de una función dependen de la extensión de la masa cerebral destruida (Goltz, 1870; Lashley, 1950). Existía evidencia de que cada una de las pequeñas zonas que conforman las áreas corticales son capaces de reproducir el comportamiento normal, originalmente bajo el control del área entera; de esta manera, el daño en una zona será compensado por el área remanente intacta. Este modelo ha perdido credibilidad debido a la demostración del papel crítico que poseen diversas áreas corticales en la integración, en la regulación y en la expresión de algunas funciones (Kolb y Whishaw, 1988; Lacour, 1989).

### **Teoría de la jerarquía funcional**

Bajo la influencia del positivismo (Comte) y de la teoría de la evolución (Darwin), Jackson (1835-1911) establece esta teoría, que media las características de los modelos expuestos por los localizacionistas y por los antilocalizacionistas; postula una jerarquía en las funciones nerviosas basada en representaciones múltiples, esto es, el SNC puede funcionar simultáneamente como un todo (modelo globalista) y con funciones específicas (modelo localizacionista). Cada función puede estar representada en varios niveles de organización (corticales o subcorticales), con los niveles más altos controlando los más bajos por medio de mecanismos desarrollados en el curso de la ontogenia. Jackson también postuló el "principio de compensación", según el cual una lesión cortical libera los niveles inferiores de la acción inhibitoria superior permitiéndoles retomar (total o parcialmente) la función original de las áreas lesionadas superiores. Dicha compensación pudiera no ser total, ya que cada nivel de organización trabaja bajo sus propias reglas y con una contribución específica para cada función (Jackson, 1875). Esta idea ha sido ampliamente apoyada, permaneciendo válida hasta nuestros días.

### **Teoría de la sustitución.**

Esta teoría es la primera en abordar la recuperación funcional desde un punto de vista puramente localizacionista. Propuesta por Munk en 1881, postula que si cada área cortical posee una función en particular, cualquier lesión en áreas específicas del sistema nervioso creará la pérdida irreversible de la función; sin embargo, la recuperación funcional permite a las estructuras intactas, originalmente no involucradas, restaurar la función del área afectada. La mayor

parte de la evidencia acumulada en favor de esta teoría proviene de estudios sobre la ceguera cortical en humanos y en monos (Singer, 1982).

En los albores de este siglo, el progreso acelerado en el estudio de la morfología del SNC, debido a Ramón y Cajal, Golgi, Betz y Brodmann, y la descripción de la citoarquitectura de la corteza cerebral, aunado a los trabajos de algunos neurofisiólogos que desarrollaron los conceptos de sinapsis (Sherrington) y de somatotopía, así como a los trabajos clínicos sobre la dominancia hemisférica izquierda en procesos de lenguaje, dieron lugar a la llamada "Era de oro del localizacionismo" (Hecaén y Lantéri-Laura, 1977). En el segundo cuarto de este siglo esta concepción perdió credibilidad y vitalidad, debido principalmente a tres factores: el mapeo cortical exhaustivo por el cual algunas de las regiones mostraron no tener relación con alguna función (las llamadas áreas de asociación), la aparición del concepto neurofisiológico desarrollado por Sherrington (1875-1952) sobre la función integrativa del sistema nervioso, y la teoría alemana de la Gestalt, que postula que una forma no es la suma de sus partes, sino que está construida con base en las relaciones entre sus diversos componentes. Fue entonces que se impulsaron las teorías globalistas, aunque tuvieron que incorporar fundamentos localizacionistas y conceptos operacionales aplicados a la actividad entera del sistema nervioso. Como fruto de estos acontecimientos tenemos las siguientes teorías y conceptos, que buscan explicar la recuperación después de una lesión nerviosa.

### **Diasquisis**

En 1914, Constantin von Monakow acuñó el término diasquisis para describir los efectos transitorios de una lesión que aparecen en regiones distantes del sitio primario de daño. Propuso que el estado de supresión de una función, es decir, su deficiencia, desaparece pasivamente en el momento en que las estructuras relacionadas con el área lesionada se recuperan del choque, y que la recuperación del comportamiento puede estar relacionada con la extensión del choque neural y con la velocidad con la cual se disipa (Stein y col, 1983; Glassmann y Smith, 1988). La pérdida de una función después de un daño en el cerebro depende de dos sucesos: primero, el daño destruye neuronas, y como éstas no son reemplazadas, los impedimentos que resultan de esta

pérdida son irreversibles. Segundo, la destrucción de las células nerviosas altera la excitabilidad de las neuronas que normalmente reciben entradas desde las células dañadas, un fenómeno denominado choque neural (o diasquisis); este efecto transináptico causado por el daño, es reversible, recuperándose las funciones asociadas conforme la excitabilidad de las neuronas denervadas regresa a la normalidad (véase Marshall, 1984; Feeney y Baron, 1986).

Actualmente, el concepto de diasquisis incluye los siguientes criterios: 1) la presencia de una lesión circunscrita, 2) bases neuronales para los efectos depresivos, 3) la participación de una estructura a distancia del sitio de daño original, 4) la identificación del tracto de fibras involucradas y 5) el proceso debe ser reversible (Kempinsky, 1966; Feeney y Baron, 1986). Sin embargo, aunque hasta ahora se cuenta con evidencia parcial de este fenómeno, tanto en animales como en el hombre, no se han podido satisfacer todos los criterios citados.

### **Teoría holística y organísmica**

En la primera mitad de este siglo Kurt Goldstein (1878-1965) desarrolló una teoría holística y organísmica del funcionamiento cerebral, la cual ha tenido repercusión en la teoría de la recuperación de funciones. El término holístico se refiere a la imposibilidad de considerar el fenómeno en forma aislada, éste debe ser considerado en el contexto del sistema biológico, su ambiente y la historia de todo el organismo. La parte medular de esta teoría se basa en los escritos de los antilocalizacionistas, en especial en los de von Monakow y en los de Jackson, quienes obtuvieron la mayor parte de sus datos de pacientes lesionados durante la primera Guerra Mundial. En estos trabajos se originaron muchos conceptos que actualmente se utilizan en la neuropsicología (véase Frommer y Smith, 1988).

Para Goldstein (1948), son necesarios tres procesos para la recuperación de la ejecución después de un daño cerebral: 1) debe existir una restitución del sustrato dañado como resultado de procesos de cicatrización del área dañada; 2) se requiere una simplificación del entorno que evite situaciones encontradas, con las cuales el individuo con un daño cerebral no es capaz de

enfrentarse; 3) el reaprendizaje de la función alterada por medio de otros sistemas que permanecen funcionales después del daño cerebral.

Los conceptos de Goldstein sobre recuperación por medio del reentrenamiento parecen coincidir con algunas ideas de las teorías de sustitución, o de lo que Finger y Stein (1982) han llamado sustitución del comportamiento (*vide infra*). En estos dos casos las partes no dañadas del sistema nervioso toman, de alguna manera, el lugar de funciones específicas de las áreas dañadas.

### **Asinapsia funcional**

Asratyan (1936) y Pavlov (1957), proponen esta teoría refiriéndose directamente al modelo de von Monakow. Postulan que la inactivación temporal de zonas intactas conectadas con el área lesionada se debe a una inhibición activa, que desempeña un papel protector, y es el resultado del incremento en las concentraciones de colinesterasa (enzima que destruye a la acetilcolina, neurotransmisor de moda en aquella época), en estructuras cercanas o lejanas a la lesión. De esta manera se produce un bloqueo sináptico (asinapsia funcional), es decir, la desactivación de dichas estructuras.

Estos conceptos dieron lugar a una de las primeras terapias farmacológicas postoperatorias, consistente en la administración de anticolinesterásicos como la neostigmina, la eserina o la galantamina, con lo cual se esperaba desinhibir las estructuras sanas, acelerando el proceso de recuperación funcional (Luria, 1949; ver Brailowsky, 1980).

### **Vicariedad**

Franz postuló, en 1923, esta teoría que define la recuperación funcional como la expresión de capacidades latentes que permiten las estructuras sanas controlar la función de otros sistemas ajenos a ellas. Esta teoría postula que las neuronas que no estaban previamente involucradas en una función en particular pueden alterar sus propiedades para asumir la función después del daño (Marshall, 1984). De hecho, resultados de varios experimentos sobre lesiones al cerebro son consistentes con esta teoría (Marshall, 1984 y 1985; Slavin y col, 1988). Por ejemplo, después de la ablación de la corteza visual en gatos, los sujetos muestran un impedimento inicial en sus capacidades de

discriminación, pero el entrenamiento postoperatorio extenso promueve un reaprendizaje. Se ha demostrado que el giro suprasilviano lateral es especialmente importante en las habilidades residuales de patrones de discriminación, y que si se daña esta estructura antes de que ocurra la recuperación de la lesión inicial (en la corteza visual), se produce una pérdida de los patrones visuales que no puede ser revertida por el reentrenamiento (Bauman y Spear, 1977); aunado a lo anterior, si sólo el giro suprasilviano es dañado, no se observan cambios en los patrones visuales (Wood y col, 1974; Marshall, 1984).

### **Sustitución del comportamiento**

La sustitución del comportamiento es la capacidad del sistema nervioso de enmascarar una deficiencia utilizando un repertorio operacional muy amplio que da lugar a nuevas posibilidades. Así, en la recuperación de una actividad motora, diversos movimientos podrán ser diferentes, pero darán por resultado el mismo comportamiento (por ejemplo, caminar) (Finger y Stein, 1982; Goldberger, 1980).

### **Ahorro o reserva (sparing) funcional**

Algunos autores utilizan el término sparing para implicar que la recuperación funcional, es consecuencia de mantener sin daño la parte del sistema neural responsable de la función (LeVere, 1980; Gage y col, 1982). La deficiencia funcional inicial es la respuesta elaborada a corto plazo por el cerebro después de sufrir el daño; al cesar esta respuesta, el tejido intacto puede asumir la función normal. Para otros autores (véase Almli y Finger, 1988), sparing es un término que implica ausencia de deficiencias específicas después de recibir la lesión cerebral. Existen estudios en sujetos con lesiones focales sufridas durante etapas y tempranas de la vida (Almli y Finger, 1984) basados en el llamado principio de Kennard, que establece que la edad es un factor importante en el proceso de restauración de una función, en otras palabras, que el estado ontogenético del sistema nervioso determina, al menos en parte, la magnitud de la recuperación, siendo esta mayor en un sujeto joven que en un adulto (Kennard y Foulton, 1942; Lacour, 1989; Finger y Almli, 1988).

## **Redundancia**

Esta teoría tiene como premisa que el sistema nervioso puede ser redundante para una función en particular, por lo que después de sufrir una lesión, aun la parte más pequeña de tejido remanente puede asumir la mayor parte de los aspectos de la función inicial (Gage y col, 1982; Almlí y Finger, 1988; Norrsell, 1988).

## **Control múltiple**

Esta teoría sugiere que cualquier función nerviosa es controlada por centros con diferente localización, de tal manera que la destrucción de uno de ellos deja en funcionamiento a los intactos (véase Rosner, 1970).

Estas dos últimas teorías han sido relacionadas con la teoría de sparing, y consideradas como mecanismos del mismo (Gage y col, 1982)

## **Compensación**

Esta teoría, derivada de la teoría de la jerarquía funcional de Jackson (vide supra), indica que debe ocurrir un cambio en los elementos remanentes de un sistema para permitir la ejecución adecuada de todo el sistema, asumiendo que inicialmente estos tejidos son incapaces de dirigir la función de todo el sistema (Goldman, 1972; Luria, 1949; Gage y col, 1982; Greenblatt, 1988).

## **Restitución**

Este concepto, utilizado por Goldberger (1972) y previamente por Luria y col (1969), establece que la recuperación funcional es el resultado de emplear el mismo mecanismo biológico utilizado antes del daño neural, por lo que las deficiencias son el producto de la interrupción de este mecanismo (véase Gage y col, 1982).

Como se puede observar, a lo largo de este siglo han proliferado y evolucionado los términos, las ideas y los conceptos sobre recuperación

funcional. De cada uno de ellos penden muchos experimentos, unos en pro, otros en contra.

## **LOS MECANISMOS**

Las lesiones al cerebro involucran a todos sus componentes: neuronas, vías nerviosas, glia, vasos, etc. Aun si las neuronas del sistema nervioso central fueran capaces de regenerar significativamente su axón, aquellas que normalmente proyectan al área dañada no encontrarían nada que inervar en su búsqueda por blancos normales. Así, en el caso de lesiones en el cerebro, se debe enfocar la atención en el tejido que sobrevive en los mecanismos que contribuyen a salvar a las neuronas que han perdido ya sea sus blancos normales o sus vías de entrada o aferencias (Steward, 1982). A continuación, se da la descripción de posibles mecanismos y algunos ejemplos experimentales con los cuales se les ha intentado sustentar.

### **Sinaptogénesis reactiva**

Esta consiste en el reestablecimiento de las sinapsis de las neuronas parcialmente denervadas por aferentes íntegras diferentes de las lesionadas, que forman parte de las aferencias habituales del grupo celular afectado (neuronas blanco). Cotman y Nadler estudiaron este fenómeno en el hipocampo. Después de lesionar la corteza entorrinal, una de las fuentes principales de aferencias al hipocampo observaron, al producir una denervación de las células granulares hipocampales, una hiperinervación de las mismas por aferentes septales, la otra fuente importante de fibras que llega al hipocampo (Cotman y Nadler, 1978; Lynch y col, 1972).

Se han podido establecer las características esenciales de este tipo de plasticidad; 1) La respuesta se inicia poco después del daño (algunos días), 2) ocurre en axones cercanos al sitio de la denervación, independientemente del neurotransmisor involucrado, 3) la reacción promueve un crecimiento de axones sólo a distancias cortas.

La sinaptogénesis reactiva ha sido relacionada por algunos autores con las teorías de la sustitución y de la compensación (Gage y col, 1982).

### **Rebrote (sprouting) regenerativo**

Este proceso ha sido propuesto como mecanismo de recuperación cuando la lesión compromete las vías aferentes de un grupo específico de neuronas blanco; básicamente, el mecanismo consiste en el crecimiento axónico (rebrote axónico regenerativo) desde las vías aferentes lesionadas, en dirección a sus células blanco habituales. Este tipo de rebrote ha sido descrito después de la axotomía de neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas de ratas adultas (Nobin y col, 1973; Nygren y col, 1974; Bjorklund y Lindvall, 1979; Wiklund y Bjorklund, 1980). El rebrote regenerativo de los axones aminérgicos dañados es muy extenso, aunque no ha sido demostrado aún que esta regeneración restablezca las conexiones sinápticas originales (Gage y col, 1982).

Si se pudiera probar que la regeneración axónica reinerva adecuadamente la misma área blanco que había sido denervada, entonces este mecanismo podría apoyar ampliamente la teoría de la restitución.

### **Supersensibilidad sináptica o hipersensibilidad de denervación**

Se refiere al aumento de la respuesta postsináptica a algunos neurotransmisores o a sus agonistas después de la deafferentación. El fenómeno fue estudiado en detalle por Cannon y Rosenblueth en su obra clásica de 1949 (para revisiones más recientes, véase Trendelenberg, 1963; McCall y Aghajanian, 1979). Uno de los ejemplos más claros de este mecanismo es la supersensibilidad de los receptores catecolaminérgicos en ratas que previamente han sido lesionadas con 6-hidroxidopamina en la sustancia nigra (Ungerstedt, 1974). La supersensibilidad puede darse por aumento en el número de receptores postsinápticos. En este caso se habla de una recuperación por compensación, como respuesta a la disminución en la concentración del neurotransmisor (Stricker y Zigmond, 1976).

### **Hiperactividad presináptica**

Este mecanismo se refiere al incremento del recambio de algún neurotransmisor o al aumento de la actividad de las enzimas que sintetizan



dicho neurotransmisor. Este fenómeno puede ocurrir en cuerpos celulares después de una denervación parcial.

Varios autores han observado estos cambios en hipocampo, estriado y locus coeruleus después de la denervación parcial de los sistemas catecolaminérgicos, por medio de lesiones mecánicas o con neurotoxinas (Acherson y col, 1980; Agid y col, 1973; Reis y Ross, 1973). Este mecanismo se ha asociado con el concepto de compensación, ya que el tejido remanente parece adaptarse después de la lesión.

### **Desenmascaramiento de aferentes silenciosas**

El enmascaramiento se refiere a los axones o sinapsis que están presentes pero que no se utilizan normalmente en una función en particular y que de alguna manera pueden participar como auxiliares cuando un sistema falla (Wall, 1980; Bach-y-Rita, 1981 a y b). Por ejemplo, Lazarus (1902) discute la formación de vías alternas en el sistema nervioso central, y considera que la terapia de recuperación de la hemiplegia cerebral y de la afasia consiste en el uso de tractos nerviosos que aún funcionan y en el uso de nuevos tractos, de tal manera que se compense el daño sufrido.

Wall (1980) refiere la existencia de un mecanismo homeostático para que en el momento de aparecer un decremento en la actividad de las entradas nerviosas, sea aumentada la excitabilidad. El efecto de este ajuste debe ser tal que la pérdida de una entrada produzca una compensación para que las entradas remanentes puedan tener efectos mayores. Así por ejemplo, un paciente experimenta con el tiempo una disminución del esfuerzo requerido para moverse conforme avanza la recuperación. Este fenómeno ha sido interpretado en términos de desenmascaramiento de vías preexistentes (véase Bach-y-Rita, 1980).

En el caso de la recuperación después de daño nervioso, las vías enmascaradas pueden ser aquellas que ya tenían un papel en la función que fue afectada por la lesión. En este caso el desenmascaramiento permitiría que las fibras remanentes ejecuten la función original realizada por la vía original (lesionada), ya sea más lentamente o en forma parcial. El

desenmascaramiento debe involucrar el fortalecimiento de estas fibras remanentes para que se alcance un aumento en su eficiencia.

Otro tipo de desenmascaramiento es aquel en el que las vías no estaban involucradas inicialmente en la función en particular, pero que por medio de un programa de entrenamiento adquieren un nuevo papel funcional.

En este caso se tendría un mecanismo con el cual se podría explicar la sustitución sensorial (*vide infra*). Éste sería el caso que mencionan Wall y Egger (1971), para mostrar que una respuesta neuronal talámica producida por la estimulación de la extremidad posterior, la cual normalmente no es detectada electrofisiológicamente, puede ser registrada después de cierto tiempo de efectuada una lesión en el núcleo gracilis (núcleo de relevo de las vías sensoriales, propioceptivas, provenientes de la médula espinal).

### **Colaterales remanentes o sustentantes**

Ramón y Cajal (1928) sugirió por primera vez una respuesta de las terminales de reserva o ahorro (*spare terminals*) como un mecanismo potencial de recuperación funcional y postuló su hipótesis colateral. La hipótesis de preservación celular postula que la presencia de axones colaterales proximales al sitio de daño proveen una barrera protectora contra la propagación retrógrada de degeneración axonal.

Thompson y col (1981), demostraron que las sinapsis monoaminérgicas en el hipotálamo no directamente deaferentado por lesiones septales, exhiben un decremento transitorio en la capacidad para captar neurotransmisores, el cual se recupera con el tiempo y espontáneamente. Después de la reacción inicial del cerebro dañado, las colaterales proximales regresan a su función normal; entonces, algunas de las deficiencias funcionales pueden estar asociadas con la reacción protectora pasajera o transitoria de terminales proximales.

Este tipo de fenómenos apoyan los conceptos de diasquisis o restitución ya que la reacción inicial responsable de las deficiencias funcionales es transitoria en las terminales intactas y la recuperación es atribuida a la extinción del choque inicial.

## **FACTORES QUE INFLUENCIAN LA RECUPERACION FUNCIONAL**

Son numerosos los factores que pueden modificar el grado, la rapidez y la calidad de la recuperación funcional. Más que hacer un inventario exhaustivo, el cual puede ser examinado en trabajos sobre tópicos específicos (Stein y col, 1974; Jeannerod y Hecaen, 1979; Bach-y-Rita, 1980 y 1990; Brailowsky, 1980 y 1988), indicamos a continuación algunos de los factores que tienen mayor influencia sobre la recuperación funcional y cuyo estudio ha permitido avanzar en el desarrollo de futuras terapias de la patología humana.

### **A. Edad**

Ya en 1876, Soltman había observado que las lesiones de la corteza motora causan deficiencias menos severas en sujetos jóvenes que en sujetos adultos. Pero fue en los años treinta cuando Kennard (1936, 1938, 1940 y 1942) realizó la demostración experimental de este fenómeno (véase Finger y Almlí, 1988). Desde entonces, el factor de la edad ha sido llamado el "principio de Kennard" dentro de la literatura científica.

Estudios recientes en monos demostraron que, para las tareas de aprendizaje que involucran alternancia espacial, el porcentaje de error después de una lesión en la corteza frontal es comparable a los controles sanos cuando el sujeto es operado durante el período prenatal (dos meses antes de término), alrededor de dos veces mayor en bebés mono (50 días posnatales) y veinte veces mayor en monos operados a los dos años de edad (Goldman, 1972; Will y Stein, 1982).

### **B. Naturaleza de la lesión**

La proporción de tejido destruido, el origen (trauma, problemas vasculares, tumores, etc), la evolución (gradual o aguda) y la naturaleza de la lesión (masiva o seriada) son parámetros que determinan la magnitud de la pérdida de la función y el grado en que puede ser recuperada. Así, una disfunción repetida en varios episodios, no podrá ser compensada hasta que no haya una interrupción permanente de la estructura afectada; esto es, con una base azarosa, las señales de error deben ser irregulares y no deben favorecer el

desarrollo de los mecanismos compensatorios. Las señales de "error" sólo podrán ser percibidas después de la destrucción permanente y total de una estructura o de un sistema. Sin embargo, si la lesión involucra un efecto lento y gradual (como un tumor), puede ser que el efecto no se note, en especial en los sujetos jóvenes; el sistema nervioso se reajustará gradualmente, realizando cambios repetidos.

Kennard (1942) realizó una comparación entre los efectos de lesiones masivas que ocurren en un tiempo y las que ocurren en forma secuencial. Su protocolo experimental fue utilizado para estudiar ablaciones, ya fueran masivas o secuenciales (a los 10, 20 y 30 días) de la corteza frontal del mono. Al evaluar con una prueba de alternancia espacial, se observó que el grupo al que se le aplicaron las lesiones secuenciales presentó mejor recuperación funcional. También se observó un menor porcentaje de error en los sujetos sometidos a lesión en intervalos de 30 días, siendo el error un poco mayor con el intervalo de 20 días y mayor al doble con el de 10 días (véase Will y Stein, 1982). Estas observaciones conductuales son compatibles con datos neuroanatómicos y neurofisiológicos que indican que la remodelación estructural y funcional requiere de un período de aproximadamente 30 días para ser más operacional.

### **C. Agentes farmacológicos**

Los tratamientos farmacológicos han sido durante mucho tiempo la esperanza para la recuperación funcional. Sin embargo, no se conoce con detalle la manera en que las moléculas, naturales o sintéticas, afectan los mecanismos fundamentales de la plasticidad del sistema nervioso.

**Fármacos.** Como regla general, los fármacos con efectos sedantes o narcóticos (fenobarbital, alcohol), disminuyen la recuperación funcional, mientras que los agentes con efectos estimulantes (anfetamina, cafeína) la aumentan (Schaeffer y Meyer, 1974). La hipótesis comunmente propuesta es que los estimulantes actúan de manera no específica, modificando el nivel de actividad general del sistema nervioso central.

**Gangliósidos.** Los gangliósidos constituyen un grupo complejo de glicolípidos que contienen ácido siálico. Son sintetizados en el aparato de Golgi, y se

encuentran en grandes concentraciones en la materia gris cerebral. Estudios recientes les asignan un papel importante en la diferenciación de las neuronas durante la embriogénesis (Dreyfus y col, 1980; Willinger, 1981) y en los procesos de regeneración en nervios periféricos y en el sistema nervioso central. Así, después de lesionar el nervio ciático, la administración local de gangliósidos produce un incremento significativo en el número de axones en rebrote (Sparrow y Grafstein, 1982), y un incremento en la velocidad de crecimiento de los brotes y en la densidad de regeneración (Kalia y Di Palma, 1982).

Factores tróficos. Hay evidencia sobre la existencia de macromoléculas directamente responsables de la viabilidad de las neuronas del sistema nervioso central. Estas proteínas especiales, genéricamente denominadas factores neuronotróficos (FNT), están presentes en altas concentraciones durante el desarrollo y son responsables del crecimiento inicial y del desarrollo de las neuronas, así como de sus procesos (Varon y Adler, 1980 y 1981; Levi-Montalcini, 1982; Berg, 1984; Thoenen y Edgar, 1985). En el adulto, la presencia de estos factores puede desempeñar el papel de mantenimiento de las células sanas. Durante el trauma, que interrumpe la función normal de estos factores, las células se encuentran en jaque y muchas neuronas mueren. La protección de neuronas dañadas o la revitalización de las mismas, podría planearse mejor si se establecieran los principios básicos de supervivencia durante la ontogenia de las neuronas (Gage y Varon, 1988). Se ha propuesto una hipótesis neuronotrófica (Appel, 1981; Hefti, 1983; Varon, 1985), que postula:

1. Las células adultas del sistema nervioso central in situ, son mantenidas y reguladas por su respectivo FNT.
2. El mantenimiento apropiado de estas neuronas depende del aporte y de la utilización adecuados de los FNT's.
3. Una interferencia con el aporte del FNT, o "deficiencia trófica" resultará en una ejecución deficiente o en la degeneración y muerte de las células blanco.

4. Las deficiencias tróficas pueden ser importantes en enfermedades degenerativas del sistema nervioso central, como las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer, o en el proceso de envejecimiento natural.

Los factores neuronotróficos pueden ser producidos por neuronas, por glia, o por ambos, y se sabe que interactúan con receptores específicos de neuronas. La interacción con un receptor en la terminal presináptica puede inducir una incorporación endocítica del complejo FNT-receptor y un transporte retrógrado activo hacia el soma de la célula. No sabemos aún si la acción primaria de los FNT es en el nivel del receptor, causando acciones intracelulares en cascada, mediante segundos mensajeros o por la acción directa del factor sobre moléculas intracelulares (Varon, 1975 y 1985; Greene y Shooter, 1980; Varon y Skaper, 1980).

Actualmente se han identificado, caracterizado y purificado sólo algunos de los FNT (cerca de una docena), y se puede decir que algunos de ellos actúan selectivamente sobre un tipo de neuronas, mientras que otros pueden actuar sobre diversas células promoviendo comportamientos específicos como sobrevivencia, elongación axonal o regulación de transmisores.

#### **D. Ejercicio, actividad y aprendizaje**

Al estudiar diversas especies varios autores, —Cowthorne (1944) y Cooksey (1946) en el hombre, Igarashi y col. (1975) en ardillas y monos y Feeney y Hovda (1983) en ratas y gatos— han demostrado el papel fundamental de la actividad sensorio-motora postoperatoria en la recuperación funcional. Estos hallazgos se sitúan dentro de un marco conceptual: la restauración funcional como modelo de reaprendizaje (Lacour, 1984), idea que implica que la actividad sensorio-motora es la base primordial para la adaptación de un organismo a las alteraciones funcionales provocadas por una lesión. Se enfatizan los efectos instructivos del ambiente y las interacciones con el sujeto. La experiencia activa después de la lesión es la fuente de una reafrentación variada, que da información para la detección y corrección de errores. La información referente a la función es correlacionada por el sujeto mediante sus actividades, de tal manera que promueve una configuración que se estabiliza con la práctica. El trabajo de Bach-y-Rita sobre sustitución sensorial (1974) en

sujetos ciegos de nacimiento es un ejemplo de estos conceptos, y muestra, además, la necesidad de la actividad y de la retroalimentación sensorio-motora durante el proceso de sustitución. Esto es, "el sistema nervioso aprende haciendo" (Lacour, 1984). Otros autores hacen hincapié en la importancia de la relación entre la actividad motora y la experiencia visual para adquirir la coordinación visuo-motora (Held y Hein, 1963).

En este modelo de reaprendizaje, se subraya la importancia de una ventana de tiempo, limitada a un período post-lesión, llamado "período sensible" o "período crítico, en el cual la adquisición del comportamiento durante un tiempo en particular después de sufrir el daño, es crucial para la posterior adaptación de la función. Resultados experimentales en monos y en gatos (Xerri y Lacour, 1980), confirman esta hipótesis. Por otro lado, Wepman (1951) y Teuber (1974) reportan la existencia de un período crítico en el reentrenamiento de pacientes afásicos, el cual coincide con las fases tempranas de la recuperación. Black y sus colaboradores (1975) hacen notar que el ejercicio activo facilita la recuperación motora después de lesionar la corteza motora de monos rhesus, y que el reentrenamiento es más eficiente si se práctica inmediatamente después de la lesión.

## **EL ESTUDIO DE LA PLASTICIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO COMO BASE DE PROCEDIMIENTOS TERAPÉUTICOS**

El objetivo práctico de los estudios sobre la plasticidad del sistema nervioso central es su aplicación en la terapéutica humana. Sin embargo, con algunas excepciones, como ciertos diseños de prótesis y el entrenamiento físico, los procedimientos derivados de estudios en animales no pueden aplicarse, en forma inmediata, a los humanos. Es importante definir los criterios para aplicar estos conocimientos a la clínica y a las circunstancias bajo las cuales deben ser aplicados:

—El procedimiento deberá ser efectivo en modelos animales con desórdenes específicos, estar de acuerdo con las mediciones funcionales (de comportamiento y fisiológicas) y con mecanismos anatómicos y bioquímicos asociados a los efectos.

—Los efectos mostrados en animales deben ser estadísticamente significativos.

— Deben estandarizarse las condiciones del procedimiento para humanos. Esto probablemente signifique investigar el mismo procedimiento en varias especies animales.

—El procedimiento debe ser efectivo en muchas especies (aunque en ocasiones es difícil probar los efectos en primates).

— Evitar reacciones adversas o efectos colaterales. Esto incluye rechazo de tejido, reacciones autoinmunes, efectos adversos de fármacos, etc (Freed y col, 1985; Freed, 1991).

Además, los procedimientos deberán ser considerados en un contexto ético, aunque aquí el criterio más importante se reduzca a los ya mencionados bajo la suposición de que ellos aumentan las posibilidades de éxito.

Existen procedimientos aplicables, en pequeña escala todavía, a los seres humanos. Tales son los casos de las manipulaciones quirúrgicas, la aplicación de fármacos o de sustancias tróficas, el trasplante de tejidos como puentes de regeneración o como fuente de nuevas células con potencial regenerativo o la estimulación artificial, la sustitución sensorial, y más recientemente, la manipulación genética de las células destinadas a ser trasplantadas. Aunque ninguno de estos procedimientos está listo para su aplicación en humanos, ya son considerados como fuentes terapéuticas potenciales. Estos sólo pueden ser utilizados para desórdenes muy bien circunscritos, como por ejemplo, la regeneración de nervios periféricos, en la enfermedad de Parkinson, etc.

Recientemente se ha mostrado que el tejido neural fetal puede ser trasplantado directamente en el tejido huésped de animales adultos, y que en condiciones adecuadas, crece sustancialmente, se integra dentro del tejido huésped, y es capaz de promover una recuperación significativa en el sistema nervioso lesionado (Sladek y Gash, 1984; Bjorklund y Stenevi, 1985; Gash y col, 1985; Dunnett y Bjorklund, 1987; Madrazo y col, 1987; Stein, 1988; Gage y Fisher 1991; *vide supra*).



Otro procedimiento utilizado frecuentemente es el farmacológico. A pesar de que los clínicos involucrados en las terapias físicas y en la rehabilitación de personas con lesiones cerebrales, raramente utilizan las drogas o los fármacos para alterar el curso de la enfermedad (la manipulación farmacológica de estos pacientes es sintomática), existen algunos ejemplos del uso de fármacos para influenciar la recuperación de lesiones en el sistema nervioso (véase Brailowsky, 1980). Durante la segunda Guerra Mundial, el grupo de Luria administró neostigmina y galantamina (agentes anticolinesterásicos) a pacientes que sufrían lesiones cerebrales y obtuvo efectos benéficos (Luria, 1969). Sin embargo, estos resultados no han sido replicados.

Otro ejemplo reciente del uso de fármacos para promover recuperación es el reportado por el grupo de Davis (Crisostomo y col, 1988), basado en los experimentos de Feeney y col (1983 y 1986). Se tomaron ocho pacientes con deficiencias motoras estables estudiadas durante los 10 primeros días después de la lesión. La ejecución motora fue registrada objetivamente 24 horas antes de la administración oral de 10 mg de sulfato de d-anfetamina o de placebo (vitaminas). Además se les suministró una intensa terapia física en los miembros afectados después de recibir la anfetamina. Se mostró una mejoría estadísticamente significativa en aquellos pacientes que recibieron anfetamina, con respecto a los que recibieron placebo. Este es un ejemplo de recuperación de habilidades motoras, promovida por efectos farmacológicos aunados a la terapia física intensiva. Estos datos, y otros obtenidos en pacientes similares con otros fármacos (Naloxona, piracetam, gangliosido I) apoyan la teoría propuesta por von Monakow (diasquisis) (Feeney y Baron, 1986).

Los ejemplos comentados ilustran la búsqueda de efectos terapéuticos efectivos. Es necesario recordar que la mayor parte de los desórdenes del sistema nervioso son fenómenos bastante complejos y parecería prematuro esperar efectos terapéuticos directos y totales en el hombre por cualquiera de estas intervenciones. Es por tanto esencial que la investigación básica sobre la plasticidad neural continúe. Sólo de esta manera encontraremos mejores opciones terapéuticas para el creciente número de sujetos que, por envejecimiento natural o por patología, se encuentran ante la dramática situación de una lesión neurológica.

## REFERENCIAS

- Acherson, AL, MJ Zigmond y EM Stricker, *Science* (1980) 207, 537-540.
- Agid, Y, F Javoy y J Glawinski, *Nature New Biology* (1973) 245, 150-151.
- Almli, CR, y S Finger, *Brain injury and recovery. Theoretical and controvertial issues.* S Finger, TE LeVere, CR Almli y DG Stein (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1988) pp 1-14.
- Almli, CR, y S Finger, *Early brain damage: Research orientations and clinical observations, Vol I* (Academic Press Nueva York, 1984).
- Appel, SH, *Ann Neurol.* (1981)10, 499 505.
- Asratyan, EA, *Usp sovr Biol* (1936) 5 (en ruso).
- Asratyan, EA, *Compensatory adaptations, reflex activity and the Brain.* SA Corson (Ed) (Pergamon Press, Londres, 1965) pp 33-74
- Bach-y-Rita P, *Tr Am Acad Ophtal Otol* (1974)78,729 740.
- Bach-y-Rita P, *Recovery of Function. Theoretical considerations for brain injury rehabilitation.* P Bach-y-Rita (Ed) (University Park Press, Baltimore, 1980) pp 225 263.
- Bach-y-Rita, P, *Arch Phys Med Rehabil* (1981) 62, 413-417.
- Bach-y-Rita, P, *Rehabilitation of the neurological patient.* L Illis (Ed) (Blackwell Press, Oxford, 1981).
- Bach-y-Rita, P, y E Wicab Bach-y-Rita, *Canada J Psychol* (1990) 44, 148-165.
- Baumann, TP, y PS Spear, *Brain Res* (1977)118, 445 168.
- Berg, DK, *Annu Rev Neurosci* (1984) 7,149-170.
- Bjorklund, A, y O Lindvall, *Brain Res* (1979)171, 271-293.
- Bjorklund, A, y U Stenevi, *Neural grafting in the mammalian CNS.* A Bjorklund y U Stenevi (Eds) (Elsevier, Amsterdam, 1985) pp 3-14
- Black, P, RS Markowitz y SN Cianci, "Outcome of severe damage to the central nervous system", *Ciba foundation Symposium 34* (Elsevier, Amsterdam, 1975) pp 65-70.
- Bliss, TVP, *TINS* (1979) 6, 42 45.
- Brailowsky, S, *Recovery of function: theoric considerations for brain injury rehabilitation.* P Bach-y-Rita (Ed) (Hans Huber Publishers, Suiza, 1980) pp 187-224.
- Brailowsky, S, *Pharmacological approaches to treatment of brain and spinal injury.* DG Stein y BA Sabel (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1988) pp 1-21.

- Brailowsky, S, BE Will y DG Stdn, El cerebro averiado (Fondo de Cultura Económica/Conacyt, en prensa).
- Cajal, SR, Degeneration and regeneration of the nervous system. RM May (Ed y trad) (Hafner, Nueva York, 1928).
- Cannon, WB, y A Rosenblueth, A law of denervation (Macmillan, Nueva York, 1949~ 245 pp.
- Cooksey, FS, Proc R Soc Med (1946) 39, 27~275.
- Cawthorne, TJ, Chart Soc Physiother (1944) 29,106-107.
- Crisostomo, EA, PW Duncan, M Propst, DV Dawson y JN Davis, Ann Neurol (1988) 23,1.
- Cotman, CW, y JV Nadler, Neuronal Plasticity. CW Cotman (Ed) (Raven Press, Nueva York, 1978) pp 227-271.
- Dreyfus, H, JC Louis, S Harth y P Mandel, Neuroscience (1980) 5, 1647-1655.
- Dunnett, SB, y A Bjorklund, J Exp Biol (1987) 132, 265-279.
- Feeney, DM, y JC Baron, Stroke (1986) 17, 817-830.
- Feeney, DM, y DA Hovda, Psychopharmacology (1983) 79, 67-71
- Feeney, DM, A González y WA Law, Science (1986) 217, 855-857
- Finger, S, y CR Almlí, Brain injury and recovery, Theoretical and controversial issues. S Finger, TE LeVere, CR Almlí y DG Stein (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1988) pp 117-130.
- Finger, S, y DG Stein, Brain damage and recovery: research and clinical perspectives (Academic Press, Nueva York, 1982).
- Finger, S, B Walbran y DG Stein, Brain Res (1973) 63,1-18.
- Freed, WJ, L de Medinaoeli y RJ Wyatt, Science (1985) 277, 1544-1552.
- Freed, WJ, Restor Nerol Neurosci (1991) 3,109.
- Frommer, GP, y A Smith, Brain injury and recovery. Theoretical and controversial issues (Plenum Press, Nueva York, 1988) pp 71-88.
- Gage, FH, SB Dunnett, A Bjorklund y U Stenevi, Scand J Psych Suppl (1982) 1, 112-120.
- Gage, FH, y LJ Fisher, Neuron (1991) 6,1.
- Gage, FG, y S Varon, Brain injury and recovery: Theoretical and controversial issues. S Finger, TE LeVere, CR Almlí y DG Stein (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1988) pp 201-214.
- Gash, DM, TJ Collier y JR Sladek, Neurobiol Aging (1985) 6, 131-150.

- Geschwind, N, Plasticity and recovery of function in the central nervous system. DG Stein, JJ Rosen y N Butters (Eds) (Academic Press, Nueva York, 1974) pp 467-508.
- Glassman, RB, y A Smith, Brain injury and recovery. Theoretical and controversial issues. S Finger, TE LeVere, CR Almlí y DG Stein (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1988).
- Goldberger, ME, Exp Brain Res (1972) 15, 79-96
- Goldberger, ME, TINS (1980) 3, 28~291.
- Goldman, PA, Neurobiol Exper (1972) 32, 495-511.
- Goldstein, K, The organism (American Book Co Nueva York, 1939).
- Goldstein, K. After effects of brain injuries in war (Grune y Stratton, Nueva York, 1948).
- Goltz, F, Plugers Arch Ges Physiol (1870) 3,172-192.
- Greenblatt, SH, Brain injury and recovery. Theoretical and controversial issues. S Finger, TE LeVere, CR Almlí y DG Stein (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1988) pp 181-190.
- Greene, LA, EM Shooter, Ann Rev Neurosci (1980) 3,353-402
- Hecaen, H, y G Lantéri-Laura, Evolution des connaissances et des doctrines sur les localization cerebrales (Desclée de Brouwer, Paris, 1977).
- Hefti, F, Ann Neurol (1983)13,109-110.
- Hefti, F, y WJ Weiner, Ann Neurol (1986) 2n 275-281.
- Held, R, y A Hein, J Comp Physiol Psychol (1963) 56, 872-876.
- Igarashi, M, BR Alford, Y Kato y JK Levy. A Otolaryngol (1975) 79, 214-220.
- Illis, LS, Brit Med J (1976)1, 458-471 .
- Jackson, H, Selecter writings. J Taylor (Ed) (Hodder Stoughton, Londres, 1932) (Churchill, Londres, 1875) pp 37-76.
- James, W, The principles of Psychology (Holt, New York, 1890)
- Jeannerod, M, y H Hecaen A daptation et restauration des fonctions nerveuses (Simep, Villcrurbanne, 1979) pp 392.
- Jennett, B, y M Bond, Lanca (1975) 1, 480-484
- Kalia, M, y JR Di Palma, Neurosci Lett (1982) 34,1-5.
- Kempinsky, WH, Arch Neurol Phychiat (1958) 79, 376-389.
- Kempinsky, WH, Res Publ Assoc Nerv Ment Dis (1966) 41, 92-115
- Kennard, MA., Am J Physiol (1936) 115, 138-146.
- Kennard, MA, J Neurophysiol (1938)1, 47-496.

- Kennard, MA, Arch Neurol Psychiat (1940) 44, 377-397.
- Kennard, MA, Arch Neurol (1942) 48, 227-240.
- Kennard, MA, y JF Foulton, J Mt Sinal Hosp (1942) 9, 594-606.
- Kolb, B, y IQ Whishaw, Brain injury and recovery. Theoretical and controversial issues. S Finger, TE LeVere, CR Almlí y DG Stein (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1988) pp 103-116.
- Konorski, J, Conditioned reflexes and neuron organization (Cambridge University Press, Londres, Nueva York, 1948).
- Lacour, M, Contribution a l'etude de la restauration des fonctions posturo-cinetiques apres labyrinthectomie chez le signe et le chat (Tesis de doctorado en ciencias, Marseille, 1981) pp 152.
- Lacour, M, Ann Otolaryngol (1984)101,177-187.
- Lacour, M, Restoration of nerve function: models and concepts. Vestibular compensation, facts, theories and clinical perspectives. M Lacour, M Touper, P Denise y Y Chisten (Eds) (Elsevier, Paris, 1989) pp 11-34.
- Lacour, M, y C Xerri, Lesion-induced neuronal plasticity in sensorimotor systems. H Flohr y W Precht (Eds)(Springer-Verlag, Berlín, 1981) pp 675-685.
- Lashley, KS, Brain mechanism and intelligence (University of Chicago Press, Chicago, 1929). ,
- Laurence, S, y DG Stein, Recovery from brain damage: Research and theory. S Finger (Ed) (Plenum Press, Nueva York, 1978) pp 369~07.
- Lazarus, PZ, Klin Med (1902) 4S, 314-339.
- LeVere, TE, Physiol Psychol (1980) 8, 297-308.
- Levi-Montalcini, R, Annu Rev Neurosci (1982) 5, 341-362.
- Luria, AR, Restoration of function after brain trauma (en ruso; Academy of Medical Sciences Press, Moscow, 1949). Traducción al inglés (Pergamon Press, Londres, 1963).
- Luria, AR, VL Naydin, LS Tsvetkova, y EN Vinarskaya, Handbook of clinical Neurology, Vol 3. RJ Vinker y GW Bruyn (Eds) (Elsevier, North-Holland, Amsterdam, 1965'~) pp 368-433.
- Lund, RD, Development and plasticity of the brain. An introduction (Oxford University Press, Oxford, 1978).
- Lynch, GS, DA Matthews, S Mosko, T Parks, CW Cotman, Brain Res (1972) 42, 311-318.
- Madrazo, I, R Drucker-Colín, V Diaz, J Martínez-Mata, C Torres y JJBecerril, N Engl J Med (1987) 316,831-834.

- Marshall, JF, *Ann Rev Psychol* (1984) 35, 277-308.
- Marshall, JF, *Int Rev Neurobiol* (1985) 26, 201-247.
- McCall, RB, GK Aghajanian, *Neuroscience* (1979) 4, 1501-1510.
- Monakow, C von, *Localization in the cerebrum and the degeneration of function through cortical sources* (JF Bergmann, Wiesbaden, 1914).
- Nobin, A, HG Baumgarten, A Bjorklund, L Lachenmayer y U Stenevi, *Brain Res* (1973) 56, 1-24.
- Norrzell, U, *Brain injury and recovery. Theoretical and controversial issues*. S Finger, TE LeVere, CR Almlí y DG Stein (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1988) pp 151-164.
- Nygren, LG, K Fuxe, G Jonson y L Olson, *Brain, Res* (1974) 78, 377-394.
- Pavlov, IP, *Experimental psychology and other essays* (Philosophical Library 63, Nueva York, 1957).
- Raisman, G, *Brain Res* (1969) 14, 25~
- Reis, DJ, y RA Ross, *Brain Res* (1973) 57, 307-326.
- Rosner, BS, *Ann Rev Psychol* (1970) 21, 555-594.
- Schaefer, KP, y DL Meyer, *Vestibular system handbook of sensory physiology II*. H H Kornhuber (Ed) (Springer, Berlín, Heidelberg, 1974) 3 pp 463-490.
- Singer, W, *Repair and regeneration of the nervous system*. JG Nicholls (Ed) (Springer-Verlag, Berlin, 1982)
- Slavin, MD, S Laurence, DG Stein, *Brain injury and recovery. Theoretical and controversial issues*. S Finger, TE LeVere, CR Almlí y W Stein (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1988) pp 165-179.
- Sladek, JR, y DM Gash, *Neural Transplants: development and function*. JR Sladek y DM Gash (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1984) pp 243-282.
- Sparrow, JR, y B Grafstein, *Exp Neurol* (1982) 77, 230-235.
- Stein, DG, *Brain injury and recovery. Theoretical and controversial issues*. S. Finger, TE LeVere, CR Almlí y DG Stein (Eds) (Plenum Press, Nueva York, 1988) pp 249-272.
- Stein, DG, S Finger y T Hart, *Behav. Neur Biol* (1983) 37, 185-222
- Stein, DG, JJ Rosen y N Butters, *Plasticity and recovery of function in the central nervous system* (Academic Press, Nueva York, 1974) pp 516.
- Steward, O, *International review of Neurobiology*. Vol 23. J. Smythier y RJ Bradley (Eds) (Academic Press, Nueva York, 1982) pp 197-254.
- Stricker, EM, y MJ Zigmond, *Progress in physiological and psychobiology*. JM Sprague y AE Epstein (Eds) (Academic Press, Nueva York, 1976) pp 121-188.

- Teuber, HL, Neurosci Res Program Bull (1974) 12, 197-209.
- Thoenen, H, y D Edgar, Science (1985) 229, 75-92.
- Thompson, RG, JJ Valdes y FH Gage, Exp. Neurol (1981) 74, 356-369.
- Trendelberg, U, Pharmacol Rev (1963) 15, 225-277.
- Tsukahara, N, H Hultborn, F Murakami y Y Fujito, J Neurophysiol (1975) 38, 135-1372.
- Ungerstedt, U, The Neurosciences. Third Study program. FO Schmitt y FG Worden (Eds) (MIT press, Cambridge, 1974) pp 979-988.
- Varon, S, Exp Neurol (1975) 48, 75-92.
- Varon, S, Disc Neurosci (1985) 2 (3), 1-62.
- Varon, S, y R Adler, Curr Top Dev Biol (1980) 16, 207-252.
- Varon, S, y R Adler, Adv Cell Neurobiol (1981) 2, 115-163.
- Varon, S, y SD Skaper, Tissue Culture in Neurobiology. E Giacobini, A Vernadakis y A Shahar (Eds) (Raven Press, Nueva York, 1980) pp 333-347.
- Wall, PD, Recovery of function: theoretical considerations for brain injury rehabilitation. P Bach-y-Rita (Ed) (University Park Press, Baltimore, 1980) pp 91-105.
- Wall, PD, y MD Egger, Nature (1971) 232, 542-545.
- Wepman, JP, Recovery from Aphasia (The Ronald Press Co, Nueva York, 1951).
- Wiklund, L y A Bjorklund, Brain Res (1980) 191, 129-155.
- Will, B, y D Stein, La récupération après lésions cérébrales (Pour la Science, Paris, 1982) pp 178-189.
- Willinger, M, Ganglioside in neurological and neuromuscular function, development, repair. MM Rapport y A Gorio (Eds) (Raven Press, Nueva York, 1981) pp 17-27.
- Wood, CC, PD Spear y JJ Braun, Brain Res (1974) 66, 443-466.
- Xerri, C, y M Lacour, Acta Otolaryngol (1980) 90, 414-424.

## TRANSPLANTES DE TEJIDO CEREBRAL FETAL

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

Durante el último siglo, los transplantes intracerebrales han evolucionado como un método para explorar el desarrollo, función y plasticidad del sistema nervioso central (SNC). En los estudios iniciales, los transplantes fueron utilizados primariamente como una técnica para el examen del desarrollo y regeneración del SNC (Le Gros Clark, 1942; Lugaro, 1906; Nathaniel y Clemente, 1959; Ranson, 1914; Tello, 1911a y b). Trabajos recientes han enfatizado el uso de los



transplantes para entender las interacciones anatómicas y funcionales entre los sistemas neurales o para reparar y reconstruir regiones dañadas del SNC. Sin embargo, varios temas relacionados con el desarrollo y plasticidad del SNC continúan siendo estudiados con gran interés y empuje, con ayuda de las técnicas de biología molecular. Asimismo la técnica de transplantes ha sido utilizada, en el área clínica, movimiento que ha generado gran interés y al mismo tiempo una considerable controversia.

La extensión y diversidad de la literatura acerca de los transplantes es enorme. Existen numerosas y generalmente muy buenas revisiones o libros sobre el tema (Bjorklund, 1991; Bjorklund y Stenevi, 1984, 1985; Cassel et al., 1992; Dunnet y Bjorklund, 1987; Dunnet y Richards, 1990; Fisher y Gage, 1993; Freed, 1986; Freed et al., 1985; Gash y Sladek, 1988; Kimble, 1990; Sladek y Gash, 1984; Seil, 1988). Lo que se pretende en esta sección es, de manera escueta, enfatizar las diversas teorías sobre los mecanismos que han sido propuestos para explicar cómo se establece la recuperación funcional a través de los transplantes de tejido cerebral fetal.

En general son tres los posibles mecanismos que se han planteado para explicar la recuperación funcional producida por los transplantes de tejido cerebral fetal en el SNC. Estos incluyen, el restablecimiento de conexiones, la producción de factores tróficos y/o de factores humorales. Brevemente se describirán algunas evidencias que apoyan a cada uno de estos mecanismos.

## RESTABLECIMIENTO DE CONEXIONES.

Diversos autores han observado una integración completa del trasplante y el huésped por medio del establecimiento de conexiones recíprocas entre ambos. Existen numerosos ejemplos al respecto, de hecho este mecanismo constituye uno de los más apoyados, puesto que, en un principio, se consideraba a los trasplantes como puentes anatómicos, destinados a restablecer las conexiones que previamente se habían perdido durante la lesión. Del mismo modo, la recuperación funcional se concibe al restablecerse las conexiones, antes perdidas. Por ejemplo, ha sido demostrado que los trasplantes talámicos pueden integrarse funcionalmente en los circuitos neuronales del huésped pocas semanas después del trasplante (Nothias et al., 1988). Se han descrito conexiones similares entre los trasplantes del hipocampo y su huésped (Daszuta et al., 1988) así como entre trasplantes de neocórtex y su huésped (Victorin, 1992). Asimismo, se ha demostrado, que las neuronas de trasplantes de tejido embrionario son capaces de producir respuestas electrofisiológicas y farmacológicas (Bassant et al., 1988; Buzsaki et al., 1987).

Con respecto a la reconexión que se establecen por medio de los trasplantes de tejido neural, existen varios ejemplos. De manera general estos pueden ser agrupados de la forma siguiente:

Los trasplantes pueden servir de puentes en los que el tejido implantado sirva como sustrato para el rebrote y regeneración de axones del SNC del huésped en dirección apropiada al tejido blanco en el mismo tejido huésped. La evidencia de dichos eventos los provee la reinervación de la formación hipocámpal por las neuronas septales del huésped en animales con lesiones de la fimbria fornix.

Este fenómeno ha sido observado en la implantación de tejido fetal de hipocampo (Kromer et al., 1981) o en tejido no neural (Davis et al., 1987; Kromer y Cornbrooks, 1985).

Los trasplantes neuronales pueden formar contactos sinápticos con el cerebro huésped que puede alterar la circuitería neural y consecuentemente la conducta del huésped. Tales inserciones del tejido transplantado en la circuitería neuronal ya existente, puede esperarse que produzca consecuencias negativas en muchos casos. Freund y sus colaboradores (1985) pudieron observar conexiones sinápticas nuevas de neuronas dopaminérgicas que reinnervan al neocórtex huésped, produciendo una circuitería alterada, la cual funcionalmente parece ser similar a la normal.

Los trasplantes pueden proveer de aferencias apropiadas, que van desde las neuronas del implante y que pueden innervar selectivamente blancos en el cerebro huésped y restaurar la función normal. Evidencia de ello lo dan los implantes de locus coeruleus en la formación hipocámpal denervada (Bjorklund et al., 1979), de células colinérgicas de septum fetal en el hipocampo denervado (Bjorklund y Stenevi, 1977), de células de hipocampo en cavidades hechas en fimbria fornix (Buzsáki et al., 1987a, Segal et al., 1981) o en heterotrasplantes de rata en ratón (Daniloff et al., 1985).

Existen casos en los que se ha probado el establecimiento de conexiones recíprocas entre los trasplantes y su huésped (Buzsáki et al., 1987).

También ha sido posible observar trasplantes neurales que causan efectos dañinos, ya sea aplicando presión sobre el cerebro huésped o creando focos de descarga anormal que se propagan al tejido huésped (Buzsaki et al, 1988).

## FACTORES TROFICOS

El estado actual de las investigaciones en torno al papel que juegan los factores tróficos en la promoción de la sobrevivencia neuronal, así como en la guía y crecimiento de axones y dendritas, no sólo durante las primeras etapas del desarrollo, sino también en el individuo adulto, como parte de los procesos de regeneración neuronal, permite pensar que tales factores intervienen de manera decisiva en la sobrevivencia e integración adecuada de los trasplantes de tejido nervioso fetal.

A este respecto se sabe que los tejidos cerebrales contienen factores tróficos que son activos *in vitro*, como promotores de sobrevivencia celular, crecimiento de neuritas y diferenciación tanto en neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC) como del Sistema Nervioso Periférico (SNP). Nieto-Sampedro y Cotman, (1986) sugieren que ciertos factores neurotróficos específicos incrementan su disponibilidad tras una lesión, contribuyendo en consecuencia a la sobrevivencia y crecimiento de los trasplantes. Así, aparentemente el cerebro responde al daño, produciendo factores tróficos que incrementan la sobrevivencia celular y promueven el crecimiento de neuritas.

En la literatura que sobre trasplantes se ha generado en los últimos años, resulta relativamente frecuente el encontrar que los fenómenos de reconexión implante-hospedero son adjudicados en buena medida a la presencia y actividad de los factores tróficos (Nieto-Sampedro y Cotman, 1986; Dekker y Col., 1992;

Dekker y Thal, 1993). Así, por ejemplo, con la participación de las técnicas de trasplante y de ingeniería genética, se han trasplantado fibroblastos modificados genéticamente, para producir Factor de Crecimiento Neuronal (FCN) y promover así, la supervivencia y crecimiento de neuronas colinérgicas en la fimbria-fornix que previamente había sido lesionada, lo que permite el restablecimiento de las proyecciones septo-hipocámpales (Olson et al., 1990; Stromberg et al, 1990)

Así pues, se propone que los factores tróficos ya sean producidos por la lesión o contenidos en el tejido trasplantado, favorecen o promueven la recuperación funcional.

#### FACTORES HUMORALES

Se ha propuesto que los trasplantes liberan factores humorales, entendiendo como tales, neurotransmisores y hormonas, principalmente, haciendo que las neuronas sensibles a estas moléculas recuperen su actividad. Así por ejemplo, la recuperación del control motor por trasplantes de sustancia nigra, de células de la médula adrenal, o de fibroblastos modificados genéticamente para producir L-DOPA, aplicados en ratas con lesiones en el sistema nigro-estriatal parece que se debe a la liberación de dopamina (Dunnett et al., 1983; Freed et al., 1981; Jinnah et al., 1989; Perlow et al., 1979). Asimismo, trasplantes hipotalámicos con altas cantidades de hormona liberadora de gonadotropinas, restablecen el funcionamiento normal en animales con deficiencias genéticas en la producción de esta hormona (Gibson et al., 1985).

En los últimos años se ha venido desarrollando la tendencia cada vez mayor, hacia el estudio de los neurotransmisores, no sólo como moléculas implicadas

en la transmisión de información, sino como participes importantes en la definición de la estructura de circuitos en los cuales participan e incluso como factores de tipo trófico (Escobar, 1993). Hallazgos recientes han mostrado el potencial de los neurotransmisores como reguladores de motilidad del cono de crecimiento axónico durante el desarrollo (Haydon et al., 1984; Goldberg y Kater, 1985), la estructura sináptica en el cerebro adulto (Desmond y Levy, 1983; Chang y Greenough, 1984) y la neurodegeneración (Coyle et al., 1983; Maragos et al., 1987). La investigación en torno al papel que juegan los neurotransmisores en la regulación de la forma neuronal, se ha encaminado hacia el análisis de las alteraciones morfológicas que pueden ocasionar los neurotransmisores al ser liberados por los axones aferentes en neuronas en desarrollo (Mattson y col, 1988).

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

## PROPOSITOS DE LA TESIS

Considerando los trabajos conductuales, anatómicos y bioquímicos de nuestro laboratorio, los propósitos de la presente tesis son:

Analizar la participación de los trasplantes de tejido cerebral fetal en la recuperación conductual, anatómica y bioquímica en los tres distintos modelos que se manejan en el laboratorio: estriado, corteza insular e hipotálamo.

Analizar la participación del factor de crecimiento neural en la recuperación conductual, al menos en los modelos de estriado y corteza insular.

Ampliar el análisis sobre los posibles mecanismos involucrados en la recuperación conductual, anatómica y bioquímica mediados por los trasplantes de tejido nervioso fetal en el cerebro adulto lesionado.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TRANSPLANTES ESTRIATALES**



**TRABAJO II**

**DIFFERENTIAL RECOVERY OF INHIBITORY AVOIDANCE LEARNING BY  
STRIATAL, CORTICAL AND MESENCEPHALIC FETAL GRAFTS.**

Piña, A.L., Ormsby, C.E., and Bermúdez-Rattoni, F.<sup>1</sup>

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

Please send all correspondence regarding this manuscript to:

Federico Bermúdez-Rattoni  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Apdo. Postal 70-600  
04510 México, D.F.  
Tel: (525) 622-5624  
FAX: (525) 548-0387  
(525) 622-5607

---

<sup>1</sup>This research was supported by a grant from DGAPA-UNAM IN- 204689 and CONACyT (0178-N9107). We thank Oreste Carbajal for his technical assistance.

### Abstract

Four groups of male Wistar rats showing disrupted inhibitory avoidance conditioning due to striatal lesions were studied. Three groups received either striatal, cortical or ventral mesencephalic brain grafts and the fourth group remained as a lesioned control. Sixty days post-graft the animals were retrained in an inhibitory avoidance task. The striatal grafted animals were the only group that significantly improved in the ability to acquire the inhibitory avoidance task. Acetylcholinesterase histochemistry revealed positive patches of cells in the striatal grafts. Cortical grafts showed less reactivity, without patches. Immunocytochemical analyses for tyrosine hydroxylase revealed positive cell reactivity in the mesencephalic grafts and few positive fibers were detected in the border between the striatal grafts and the host tissue. These results demonstrate that striatal but not cortical or mesencephalic brain grafts can promote the restoration of the ability to acquire an inhibitory avoidance task, and suggest that the acetylcholine tissue content is involved in the behavioral recovery.

Descriptive phrases: AChE, Cortical grafts, Functional recovery, Intrastratial grafts, Learning, Tyrosine hydroxylase immunoreactivity.

Running Head: Recovery of learning.

Several studies have shown that embryonic neural tissue is able to survive transplantation into the adult mammalian brain. The considerable capability of the embryonic tissues to reinnervate and induce functional recovery in the host brain has also been shown (Björklund & Stenevi, 1984; Dunnet & Björklund, 1987; Freed, Medinaceli & Wyatt, 1985). The striatum is probably the most extensively explored region for combined morphological and functional studies of intracerebral grafted neurons. Either blocks or dissociated cell suspensions of fetal striatal tissue have shown to survive and differentiate in the caudate-putamen of adult lesioned rats (Isacson, Brundin, Kelly, Gage, & Björklund, 1984; Sanberg, Hanault & Deckel, 1986). Striatal grafts produce recovery of abnormal motor activity and imbalances due to damage of the nigro-striatal pathway (Dunnett, Isacson, Sirinathsinghji, Clarke & Björklund, 1988; Sanberg et al., 1986) as well as of learning deficits in striatum-lesioned rats (Deckel, Moran, Coyle, Sanberg & Robinson, 1986).

The interference of normal striatal activity by means of electrolytic lesions (Packard & White, 1990; McDonald & White, 1993) microinjections of anticholinergic drugs (Bermúdez-Rattoni, Mújica-González & Prado-Alcalá, 1986) or neurotoxins (Sandberg, Sanberg, Hanin, Fisher, & Coyle, 1984) lead to a marked impairment in the acquisition of conditioned responses, i.e. inhibitory avoidance, radial maze learning or autoshaping conditioning (Bermúdez-Rattoni et al., 1986; Packard & White 1990; White, 1989; McDonald & White, 1993).

In the present work we have studied the effect of striatal, mesencephalic and cortical grafts on the recovery of inhibitory avoidance learning in striatal lesioned rats. In addition, immunocytochemistry for tyrosine hydroxylase (TH), acetylcholinesterase (AChE) histochemistry and Nissl staining techniques were performed on the animals' brains.

Seventy male Wistar rats weighing 250-290g were randomly assigned to one of two groups (control intact rats CON n=20 and lesioned group n=50). Two large bilateral electrolytic lesions were made under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg) to encompass the dorsal striatum (stereotaxic coordinates: AP= -0.5, L=  $\pm$ 3.5, DV= -5.5 and -6.5, from skull level). Following post-operative recovery (8 days) each animal was trained and tested in a step-through inhibitory avoidance task, conducted in a shuttle box (40x15x20 cm) divided in two compartments by a sliding door. One of the compartments was illuminated by a 40W light bulb. The other compartment was not illuminated and had metal floor, through which a brief electric shock could be delivered. During the acquisition session the animal was placed in the illuminated compartment for 30 sec. After this period the rat was allowed to enter the dark compartment. When the four paws of the rat were inside the dark compartment, the door was closed and a 0.8 mA DC footshock was delivered for 3 sec. The animal was then allowed to escape to the safe (illuminated) compartment. Twenty-four hours later the same procedure was followed except that the footshock was not delivered (test session). Two more extinction tests were performed at 48 and 72 hr after the acquisition session. For each session, the time (latency) that the rat took to move from the illuminated to the dark compartment was noted.

Fifteen days after surgery, the lesioned animals were divided in 4 subgroups: one group remained lesioned (LX; n=22), the other groups received either striatal homotopic grafts (ST; n=12), mesencephalic (ventral mesencephalon; MS; n=9) or frontal cortex (G-CX; n=7) grafts. Fifteen-day-old fetuses (crown-rump length 13-15 mm) were removed from the abdominal cavity of anesthetized pregnant rats. The fetal brains were removed, and the striatum, frontal cortex or ventral mesencephalon was dissected under a

stereoscopic microscope. Solid blocks of tissue approximately 3 mm<sup>3</sup>, were injected bilaterally through a 100µl Hamilton syringe, into the area where the previous lesion was made. After 8 weeks, all animals were retrained for inhibitory avoidance.

After the experiment, all the rats from LX, ST, MS and CX groups were sacrificed and perfused through the ascending aorta with a saline solution (0.15M) followed by a 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde solution in phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4, 0.1 M phosphate and 0.15 M NaCl). The brains were extracted and immersed for two hours in the same fixation solution and then immersed in 20% sucrose in PBS for 24 hr before sectioning. Serial sections were cut in a freezing microtome at 40 µm thickness, collected in PBS and processed for visualization on either of the following procedures: standard procedure for cresyl violet staining, Acetylcholinesterase histochemistry (AChE), or immunocytochemistry for tyrosine hydroxylase (TH). AChE were carried out on slide mounted sections according to a modified Paxinos and Watson's (1982) protocol; briefly, the slides were incubated overnight in 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0, 4 mM copper sulfate, 16 mM glycine, 4 mM acetylthiocholine iodide and 0.1 mM ethopropazine. After incubation the slides were immersed into a developing solution (1% sodium sulfide pH 7.5) for 10 minutes. TH immunocytochemistry was visualized by using primary antibodies (Eugene Tech. International, Inc.) at a dilution of 1:500. The sections were incubated during eight days and then developed with a rabbit IgG avidin-biotin immunoperoxidase kit (Vector Laboratories). All tissues were mounted with synthetic resin (Permount).

Non-parametric statistics were tested on latency scores for inhibitory avoidance (Kruskal-Wallis was done for comparisons among groups, and

post-hoc two tail, Mann-Whitney U-test for comparisons between groups). During the acquisition session there were no significant differences among groups (Fig. 1). During the first test trial there were differences among groups ( $p < 0.01$ ). As expected, the control group showed a high latency and all the lesioned animals showed significantly lower latencies ( $p$ 's  $< 0.01$ ).

The post-graft comparisons (Fig. 1) for the acquisition day revealed that there were significant differences between groups ( $p < 0.05$ ). The CON group showed a significantly higher latency compared with the ST, MS and LX groups ( $p$ 's  $< 0.05$ ). During the test day the analyses revealed significant differences among groups ( $p < 0.01$ ). The CON group and the animals that received the striatal grafts (ST) showed the highest latency and there were no statistical differences between them, indicating that those groups showed a good acquisition of the task. The groups receiving mesencephalon (MS) or cortical (CX) grafts still showed impaired learning with significant lower latencies when compared with the CON and ST groups ( $p$ 's  $< 0.05$ ). Although, the CX and LX group showed a slightly higher latency than the MS group.

---

FIGURE 1 ABOUT HERE

---

Histological examination revealed that the striatal lesions involved most of the dorsal area of the striatum, and the extensions of the lesions were on average 2.0 mm in the dorsoventral plane and 3.5 mm in the anteroposterior plane, the ventricles always appeared to be enlarged (Fig. 2). The homotopic

brain transplants seemed to be healthy and placed in the appropriate target area of the host brain (Fig. 3A). The acetylcholinesterase histochemistry had a strong reaction in the intact striatum. Strong positive AChE patches of cells could be observed within the graft (Fig. 3A and 3B). Positive immunoreactivity for TH was observed in fibers in the border of the graft with the host tissue (Fig. 3C and 3D).

The heterotopic (ventral mesencephalon, MS) grafts appeared to be healthy and well placed, but they were less extensive than the striatal grafts (Fig. 3E). Reduced AChE reactivity (Fig. 3F) and positive immunoreaction for TH was found in cell bodies and fibers within the mesencephalic grafts (Fig. 3G and 3H). The cortical grafts appeared to be healthy and larger, although the AChE reactivity seemed to be less strong and without patches as compared with the striatal grafts (Fig 3I, 3H, 3J and 3K). There was a complete absence of TH immunoreactivity inside the cortical grafts (Fig. 3L).

-----  
FIGURE 2 AND 3 ABOUT HERE  
-----

These results indicate that intrastriatal grafts taken from striatum, but not from ventral mesencephalic or cortical fetal tissue, were able to promote the recovery in the ability to acquire the inhibitory avoidance task from the deficit produced by large electrolytic lesions of the striatum. Moreover, the lesioned group did not show spontaneous recovery at the retraining trial. The histological findings, revealed strong positive AChE patches of cells in the



striatal graft tissue, whereas the mesencephalic grafts showed immunoreactive TH cells. Positive AChE reactive fibers and somas without patches were detected in the cortical grafts, but no immunoreactivity for TH. These results suggest that tissue neurotransmitter content is involved in the recovery of inhibitory avoidance conditioning.

Similar results have been found in other areas and with different tasks. It has been demonstrated that homotopical cortical grafts transplanted into the insular cortex induce behavioral recovery of taste aversion conditioning whereas heterotopical (occipito-cortical or tectal) grafts were ineffective (Escobar, Fernández, Guevara-Aguilar & Bermúdez-Rattoni, 1989; López-García, Fernández-Ruiz, Bermúdez-Rattoni & Tapia, 1990). Biochemical analyses revealed that homotopical (insular) but not heterotopical (occipital) grafts released ACh (López-García et al., 1990). In this regard, preliminary results in our laboratory showed that striatal grafts are able to release acetylcholine after 60 days post-graft, whereas the glutamate decarboxilase activity remained significantly lower in both striatal and mesencephalic grafts when compared to controls.

It has been postulated that where grafts are located is an important variable for behavioral recovery. Thus, several studies have reported recovery of motor activity imbalances by striatal grafts within the striatum (Isacson et al., 1984; Sanberg et al., 1986). When the striatal grafts were located outside the striatum; (e.g., globus pallidus) there was less behavioral recovery (Isacson, Brundin, Kelly, Gage, & Björklund, 1986). Other authors have found no functional recovery when the whole striatal grafts were located in the lateral ventricles (Sanberg et al., 1986). In our results, the striatal and cortical grafts seem to be growing from the lesioned area, usually in the ventricle, aside the host tissue, whereas the mesencephalic grafts were always found incorporated

in the host striatal tissue. These findings suggest that the graft location is not a crucial factor for recovery of inhibitory avoidance as it has been reported for motor activity (Dunnett & Björklund, 1987). In addition, it appears that the tissue growth size does not have any participation on functional recovery, indicated by the fact that cortical grafts were larger than the striatal grafts, but did not promote behavioral recovery.

The present results suggest that the specific anatomical origin of the fetal grafts is important for the induction of functional recovery. In regard to the last proposition, the graft-induced functional recovery has often been attributed to the reconstruction of damaged neural circuitry in the host brain (Dunnett & Björklund, 1987; Björklund & Stenevi, 1984; Escobar et al, 1989; Victorin, 1992). Although, other mechanisms such as acute trophic influences on the host tissue (Cotman & Kesslak, 1988) or release of neurochemicals or neurotransmitters have also been proposed (Freed et al., 1985 ). Thus, other studies have demonstrated that the striatal cholinergic activity is a critical point in learning processes (Bermúdez-Rattoni et al., 1986; Prado-Alcalá, 1985; Sandberg et al., 1984). The cholinergic blockade of the striatum leads to a marked impairment in the retention of previously learned behaviors maintained by positive (Bermúdez-Rattoni et al., 1986) and negative reinforcers (Prado-Alcalá, 1985). Cholinergic stimulation of this structure produces significant improvement of the same type of behaviors (Prado-Alcalá, 1985). Our results indicate that striatal grafts with strong positive AChE reactivity produced the highest behavioral recovery for inhibitory avoidance. The cortical grafts, with some AChE reactivity and without patches, produced an incomplete and non significant recovery in the ability of the lesioned rats to learn the inhibitory avoidance task. Mesencephalic grafts were unable to recover the learning task. These results

suggest that tissues' acetylcholine content could be involved in the behavioral recovery for inhibitory avoidance learning.

## BIBLIOGRAPHY

- Bermúdez-Rattoni, F., Mújica-González, M. & Prado-Alcalá, R.A. (1986) Is cholinergic activity of the striatum involved in the acquisition of positively-motivated behaviors? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24, 715-719.
- Björklund, A. & Stenevi, U. (1984) Intracerebral neural implants: neural replacement and reconstruction of damaged circuitries. *Annual Review of Neuroscience*, 7, 279-308.
- Cotman, C.W. & Kesslak, P. (1988) The role of trophic factors in behavioral recovery and integration of transplants. In D.M. Gash & J.R. Sladek (Eds.), *Progress in Brain Research Vol. 78* (pp. 311-319). Amsterdam: Elsevier.
- Deckel, A.W., Moran, T.H., Coyle, J.T., Sanberg, P.R. & Robinson, R.G. (1986) Anatomical predictors of behavioral recovery following striatal transplants. *Brain Research*, 365, 249-258.
- Dunnett, S.B. & Björklund, A. (1987) Mechanisms of function of neural grafts in the adult mammalian brain. *Journal of Experimental Biology*, 132, 265-289.
- Dunnett, S.B., Isacson, O., Sirinathsinghji, D.J.S., Clarke, D.J. & Björklund, A. (1988) Striatal grafts in the ibotenic acid-lesioned neostriatum: functional

studies. In D.M. Gash & J.R. Sladek (Eds.), *Progress in Brain Research* Vol. 78 (pp. 39-45). Amsterdam: Elsevier.

Escobar, M., Fernández, J., Guevara-Aguilar, R. & Bermúdez-Rattoni, F. (1989) Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesions. *Brain Research*, 478, 368-374.

Freed, W.J., Medinaceli, L. & Wyatt, R.J. (1985) Promoting functional plasticity in the damaged nervous system. *Science*, 227, 1544-1552.

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

Isacson, O., Dunnett, S.B. & Björklund, A. (1986) Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington's Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 83, 2728-2732.

López-García, J.C., Fernández-Ruiz, J., Bermúdez-Rattoni, F. & Tapia, R. (1990) Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts. *Brain Research*, 523, 105-110.

McDonald, R.J. & White, N.M. (1993) A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 107, 3-22.

Packard, M.G. & White, N.M. (1990) Lesions of the caudate nucleus selectively impair reference memory acquisition in the radial maze. *Behavioral and Neural Biology*, 53, 39-50.

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

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

Sanberg, P.R., Hanault, M.A. & Deckel, A.W. (1986) Locomotor hyperactivity: effects of multiple striatal transplants in an animal model of Huntington's Disease. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 25, 297-300.

Sandberg, K., Sanberg, P.R., Hanin, I., Fisher, A. & Coyle, J.T. (1984) Cholinergic lesion of striatum impairs acquisition and retention of a passive avoidance response. *Behavioral Neuroscience*, 98, 162-165.

White, N.M. (1989) A functional hypothesis concerning the striatal matrix and patches: mediation of S-R memory and reward. *Life Sciences*, 45, 1943-1957.

Wictorin, K. (1992) Anatomy and connectivity of intrastriatal striatal transplants. *Progress in Neurobiology*, 38, 611-639.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Post lesion and post graft inhibitory avoidance performance in the control (CON) and experimental groups: lesioned (LX), striatal grafts (ST), cortical grafts (CX) and mesencephalic grafts (MS). Comparison with their own control groups. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . (Mann-Whitney U-test).

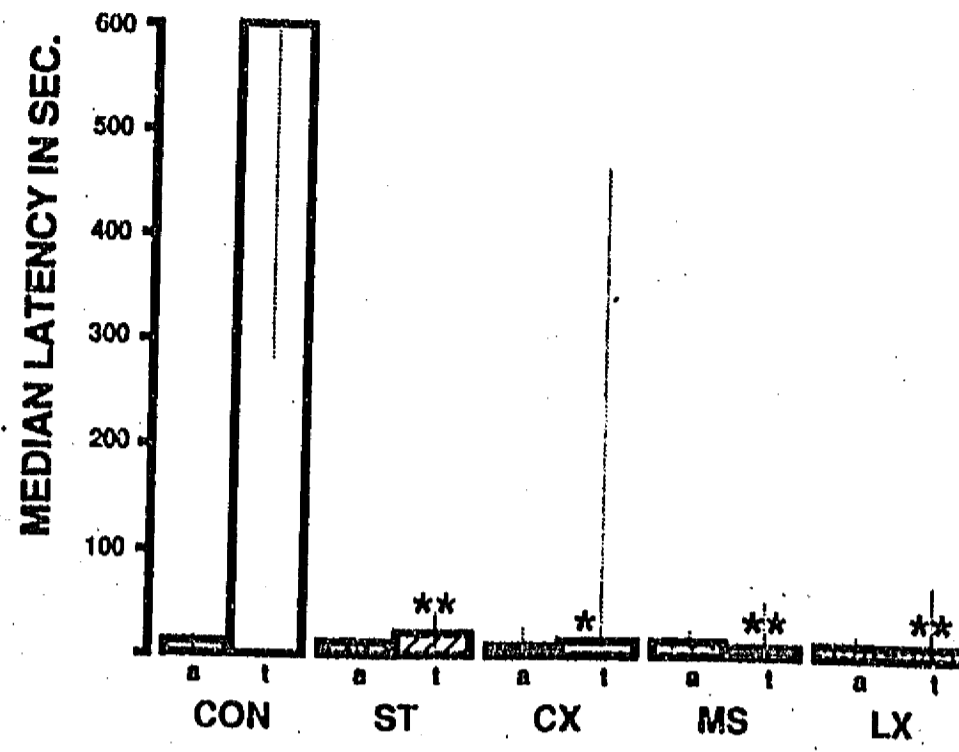
Figure 2. Schematic representation of a typical dorsal striatal lesion. The numbers contiguous to each section indicate the AP coordinate with respect to bregma (Paxinos & Watson, 1982).

Figure 3. Representative coronal sections for striatal (A,B,C and D) mesencephalic (E,F,G and H) and cortical grafts (I,J,K and L). A. Cholinesterase histochemistry in a coronal section of a striatal graft. Arrows show the border of the graft (g). Strong positive reaction is observed in the host tissue (h) and the patches of cells inside the graft (x20) B. Magnification of (A). Arrows show a patch of cells positive to the AChE histochemistry (x200). C. Striatal graft with positive fibers immunoreactive for tyrosine hydroxylase (TH) in the border of the graft (arrows) (x20). D. Magnification of (C). Arrows show the TH positive fibers (x200). E. Cholinesterase histochemistry in a mesencephalic graft (x20). F. Magnification of (E). Note the weak reaction for the AChE histochemistry inside the graft (x200). G. TH immunoreaction in cell bodies and fibers in the substantia nigra grafts (x200). H. Magnification of (G). Arrows show positive immunoreaction for TH in cell bodies in the substantia nigra graft (x400). I. AChE histochemistry in cortical graft, arrows show the border of

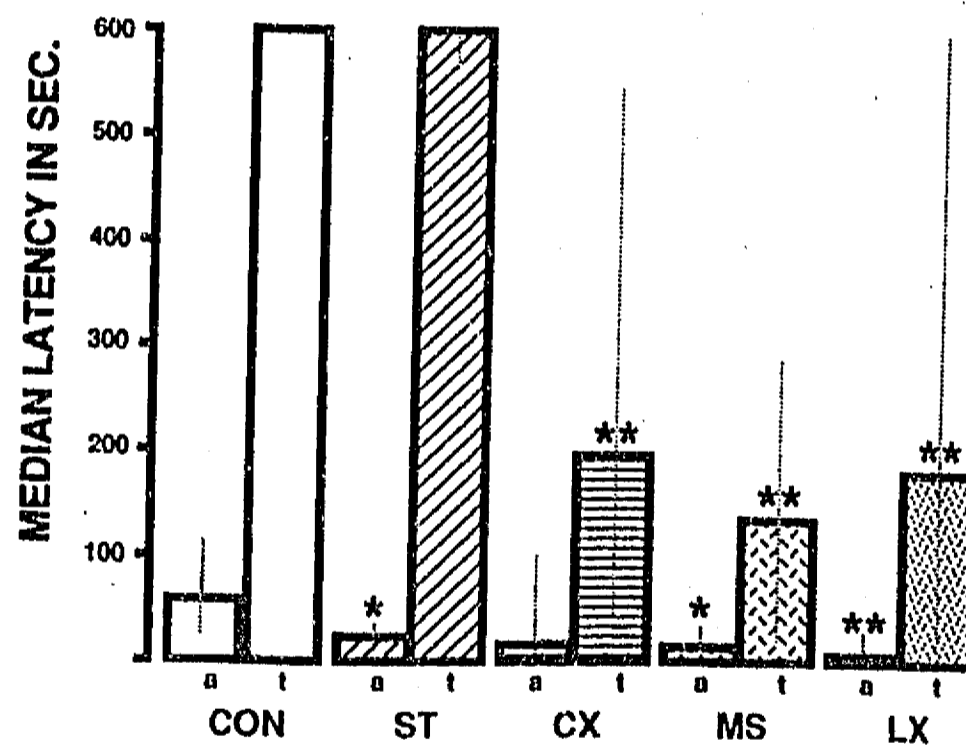
the graft (x20). J. Amplification of (I) (x200). The square shows some cell reactivity for AChE. K. Magnification from square in (J)(x400), showing cells positive for AChE. L. TH immunocytochemistry for cortical grafts. Note the absence for positive TH immunoreactivity. Arrow heads show the border of the graft (x20). All bars represent 100  $\mu$ m.

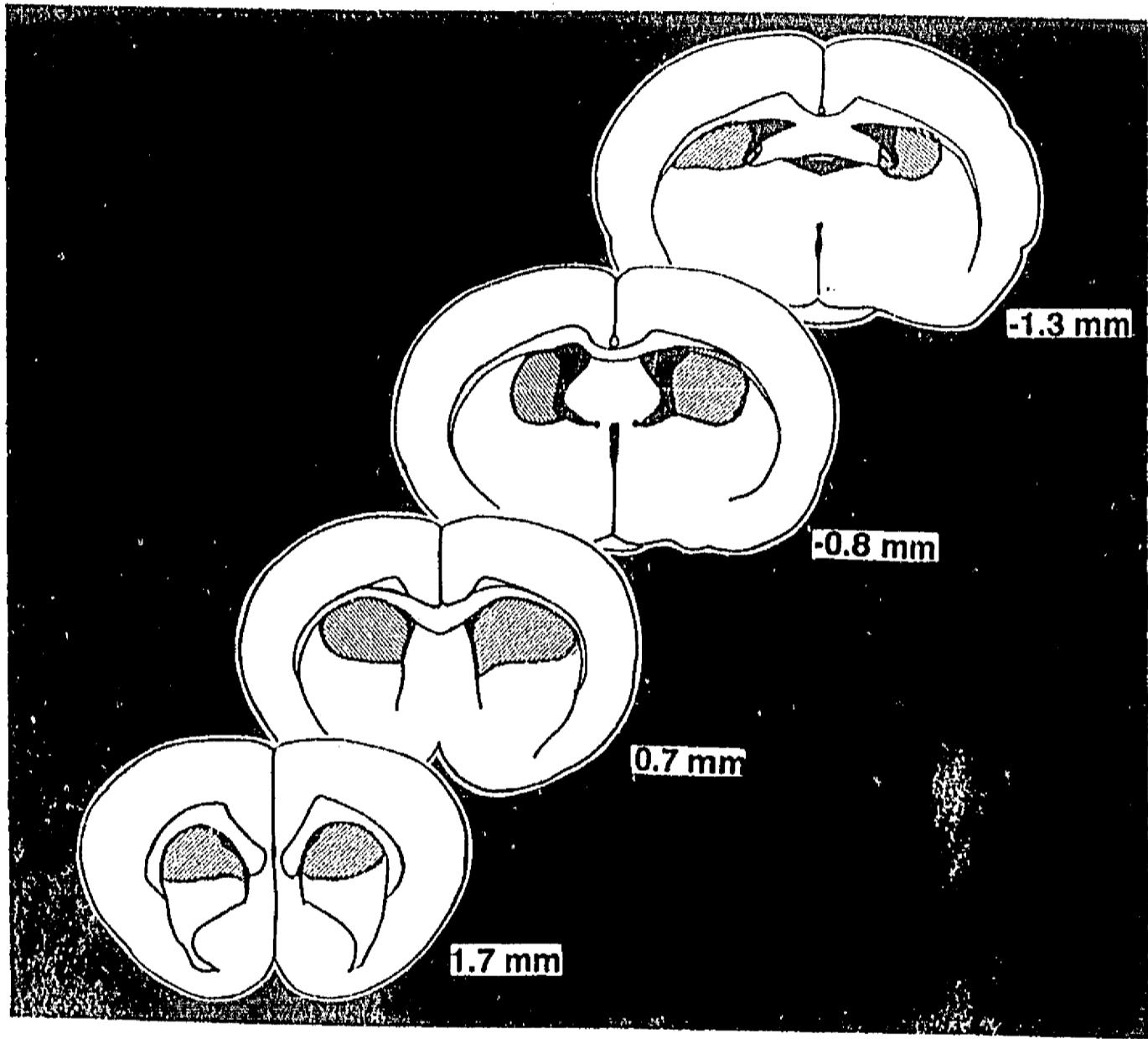


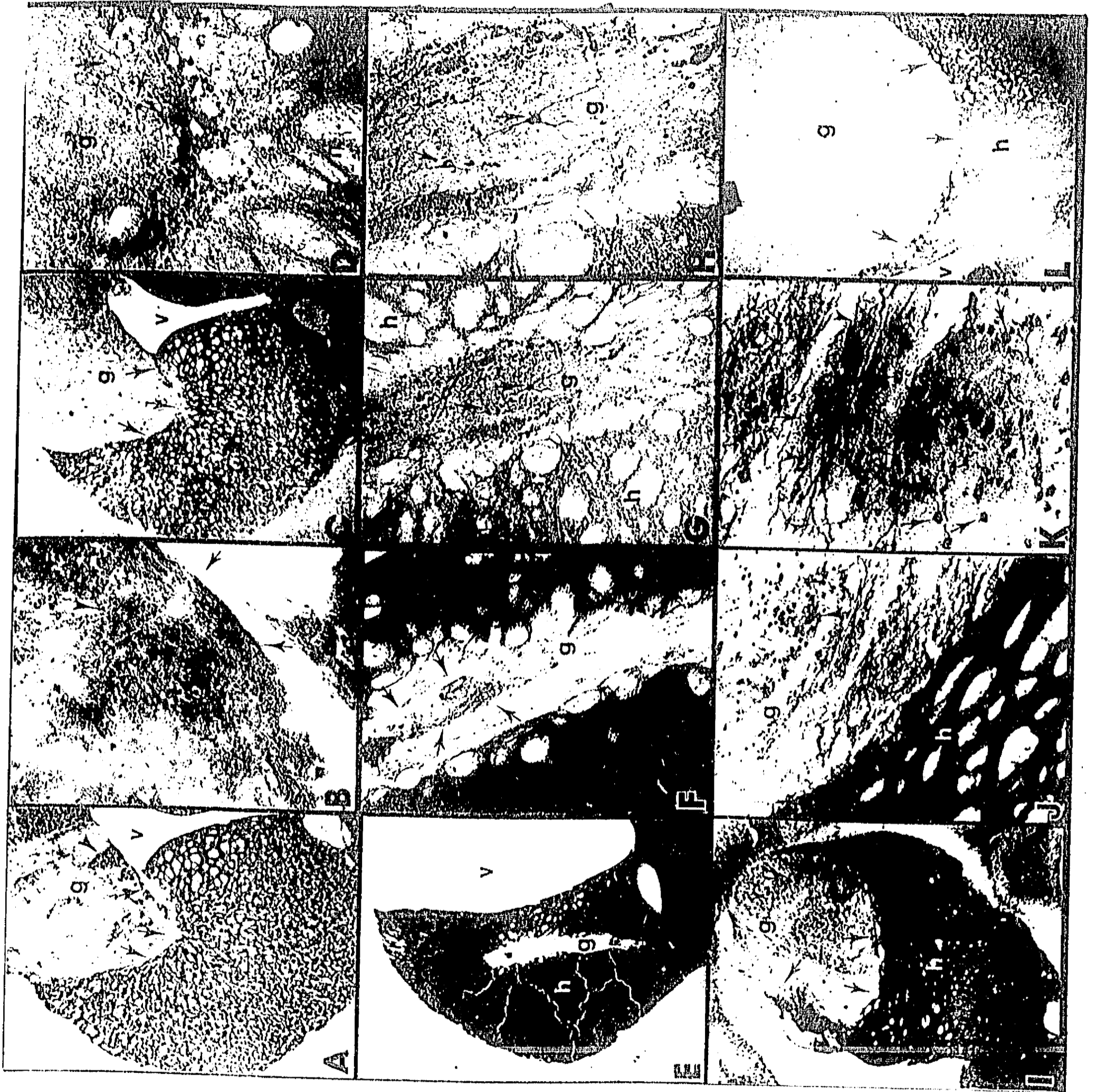
### POST LESION



### POST GRAFT







**TRABAJO III**

**GRAFT-INDUCED RECOVERY OF INHIBITORY AVOIDANCE  
CONDITIONING IN STRIATAL LESIONED RATS IS  
RELATED WITH CHOLINE ACETYLTRANSFERASE  
ACTIVITY.**

Ana Luisa Piña, Christopher Edward Ormsby, María Isabel Miranda,  
Nicolás Jiménez, Ricardo Tapia and Federico Bermúdez-Rattoni.

Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de  
México. Departamento de Neurociencias. Ap. Postal 70-253. 04510  
México D.F. México.

**KEY WORDS:** Striatal Grafts, Inhibitory Avoidance, Choline  
Acetyltransferase.

**Correspondence:** Ana Luisa Piña <sup>c/o</sup> Federico Bermúdez-Rattoni. Instituto de Fisiología  
Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. Ap. Postal 70-253. México D.F. 04510.  
México. Phone (525) 622-56-24; Fax (525) 622-56-07; E-mail bermudez@redvax  
1.dgsca.unam.mx or fbermude@ifcsun1.ifisiol.unam.mx

**RUNNING HEAD:** Functional recovery is correlated with ChAT  
activity..

## SUMMARY

Four groups of male Wistar rats showing disrupted inhibitory avoidance conditioning due to striatal lesions received either striatal or ventral mesencephalic brain grafts. Two additional unlesioned groups were used as controls. Half of the groups were retrained in an inhibitory avoidance task at fifteen days postgraft and the other half was retrained at sixty days postgraft. Those animals that received striatal grafts significantly improved their ability to acquire the inhibitory avoidance task at fifteen and sixty days postgraft, as opposed to those that received mesencephalic grafts, which did not show behavioral recovery. Choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase activities, as well as dopamine content, were measured in the grafted tissue. Striatal grafts showed levels of choline acetyltransferase activity similar to the control group. Moreover, a positive correlation was found between the choline acetyltransferase activity and the behavioral recovery. In contrast, both glutamate decarboxylase activity and dopamine levels were significantly lower in striatal and in mesencephalic grafts, as compared to the controls. These results show that striatal but not mesencephalic grafts can promote the restoration of the ability to acquire an inhibitory avoidance task even at early stages (15 days) of the development of the grafts. The results also suggest that acetylcholine plays an important role in such early behavioral recovery

Several reports indicate that neural grafts can promote the recovery of lesioned rats from functional deficits (3, 5, 6). In particular, grafts of striatal fetal tissue implanted into the lesioned striatum can reverse many of the functional and behavioral deficits associated with neostriatal damage (4, 9, 10, 24, 29). In our laboratory, it has been demonstrated that striatal but not mesencephalic grafts can promote the recovery of inhibitory avoidance conditioning in bilaterally lesioned rats at 60 days post-transplantation, whereas lesioned animals do not show spontaneous recovery (22).

In this report, we assess the effects of striatal grafts on the recovery of the ability to acquire a passive avoidance learning task in striatal lesioned animals at fifteen and sixty days. In addition, we performed biochemical determinations of choline acetyltransferase (ChAT) and glutamate decarboxylase (GAD) activities and dopamine content in the grafted tissue, and correlated them with the behavioral recovery.

One hundred and fiftyfour male Wistar rats weighing 250-290g were randomly assigned to one of two groups (control intact rats, CON n= 42, and lesioned group, n= 112). Large bilateral electrolytic lesions were made under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg) by means of a 1 min, 2mA catodic current to encompass the dorsal striatum (stereotaxic coordinates: AP= -0.5, L=±3.5, DV=-5.5 and -6.5, from skull level; incisor bar -5.0mm). Following post-operative recovery (8 days) each animal was trained and tested in a step-through inhibitory avoidance task conducted in a shuttle box (40x15x20 cm) divided in two compartments by a sliding door. One of the compartments was indirectly illuminated by a 40W light bulb. The other compartment was not illuminated and had a metal floor through which a brief electric shock could be delivered. During the acquisition session each animal was placed in the illuminated compartment for 30 sec, after which the rat was allowed to enter the dark compartment. When

the four paws of the rat were inside the dark compartment, the door was closed and a 0.8 mA DC footshock was delivered for 3 seconds. The animal was then allowed to escape to the safe (illuminated) compartment. Twenty-four hours later the same procedure was followed except that the footshock was not delivered (test session). For each session, the time (latency) that the rat took to move from the illuminated to the dark compartment was noted. Two more extinction tests were performed at 48 and 72 hours after the acquisition session.

Fifteen days after surgery, the lesioned animals were randomly assigned to 2 subgroups: one group received striatal fetal tissue (ST), and the other received mesencephalic fetal tissue (MS). Fifteen day-old fetuses (crown-rump length 13-15mm) were removed from the abdominal cavity of anesthetized pregnant rats. The fetal brains were removed, and the striatum and ventral mesencephalon were dissected under a stereoscopic microscope. Solid blocks of tissue approximately 3 mm<sup>3</sup>, were injected bilaterally through a 100µl Hamilton microsyringe, into the area where the previous lesion was made. All the groups were then divided in two subgroups, which were retrained for inhibitory avoidance at 15 (ST-15, n= 31; MS-15, n= 21, CON-15, n= 19) and 60 days post-graft respectively (ST-60, n= 31; MS-60, n= 29; CON-60, n= 23).

At the end of the experiment, rats from ST, MS and CON groups were decapitated and the brains were rapidly removed and dissected on ice. Graft tissue was carefully obtained. For dopamine determinations (ST-15, n=9; MS-15, n=9; CON-15, n=4; ST-60 n=18; MS-60 n=17; CON-60 n=13) the tissue was weighed and homogenized on ice in perchloric acid containing dihydroxybenzylamine (DHBA). The homogenates were centrifuged, the supernatants were filtered and 20µl were used for the HPLC/electrochemical detection (Beckman, System Gold) of catecholamines, by the method previously described (27). Concentration of standard solutions of noradrenaline, dopamine



and serotonin were ran in parallel in order to make the quantitative calculations (27). ChAT (14, 17, 18) and GAD activities (1, 17) (ST-15, n=22; MS-15, n=12; CON-15, n=15; ST-60, n=13; MS-60, n=12; CON-60, n=10) were measured in water homogenates of the grafted tissue by radioisotopic techniques previously described in detail, using [3H] acetyl-coenzyme-A or [1-14C]-L-glutamic acid (Amersham, Buckinghamshire, UK) as substrates. Some of the tissue samples that were used for determinations of ChAT activity were also used for measuring GAD activities. Protein was determined using the Folin reagent method (19).

Nonparametric statistics were applied on latency scores for inhibitory avoidance. Kruskal-Wallis test was applied for comparisons among groups, and post hoc two tail Mann-Whitney U-test for comparisons between groups. For the biochemical measurements, one-way ANOVA was applied with post hoc Fisher analyses.

For the fifteen day-old grafts, the post-lesion and post-graft results are shown in Figure 1A. The post-lesion acquisition sessions showed no significant differences among groups. During the first test trial (post-lesion) there were differences among groups ( $p < 0.01$ ). As expected, the control group showed the highest latency and all the lesioned animals showed significantly lower latencies ( $p$ 's  $< 0.01$ ). The post-graft comparisons for the acquisition day revealed significant differences between groups ( $p$ 's  $< 0.05$ ) for 15 day-old grafts. The statistical analysis of acquisition at 15 days revealed that the CON-15 group showed a significantly higher latency compared with the ST-15 and MS-15 groups ( $p$ 's  $< 0.05$ ). During the test day the analyses revealed significant differences among groups ( $p < 0.01$ ). The CON-15 group and the animals that received the striatal grafts (ST-15), showed the highest latency and there were no statistical differences between them, indicating that those groups showed a good acquisition of the task. The groups receiving mesencephalon (MS-15) still

showed impaired learning with significantly lower latencies when compared with the CON-15 and ST-15 groups ( $p's < 0.05$ ).

Results from post-lesion and post-graft sessions for sixty day-old grafts are shown in figure 1B. The analysis for post-lesion acquisition and test sessions showed similar results to those at fifteen days. That is, in the acquisition session the groups showed similar latencies. During the test session there were significant differences between groups ( $p < 0.01$ ). The lesioned animals showed significantly lower latencies in comparison with the control group ( $p's < 0.01$ ). Similarly, the analysis for the acquisition at 60 days post-graft revealed that there were significant differences among groups ( $p < 0.01$ ). The CON-60 group showed significantly higher latencies as compared with the ST-60 and MS-60. During the test session the CON-60 and ST-60 groups showed the highest latencies, and there were no significant differences between them. The MS-60 group showed impaired learning with significantly lower latencies when compared with CON-60 and ST-60 groups ( $p's < 0.05$ ).

#### FIGURE 1 ABOUT HERE

The results of the determination of ChAT and GAD activities and dopamine content are shown in Fig. 2. The ANOVA for ChAT activity revealed significant differences among groups ( $F_{2,46} = 4.993$ ,  $p < 0.01$ , for 15 days post-graft;  $F_{2,32} = 14.865$   $p < 0.01$  for 60 days post-graft). The ChAT activity in striatal grafts, either at 15 or 60 days, was similar to that of the intact control tissue, whereas that in mesencephalic grafts was only 22.9% (for 15 day-old grafts) and 35.2% (for 60 day-old grafts) as compared with their control groups. In contrast, GAD activity was significantly lower than the control in both striatal and mesencephalic groups ( $F_{2,26} = 2.366$ ;  $p < 0.01$  at 15 day-old post graft). In

addition, a Spearman rank correlation showed that ChAT activity had a significant positive correlation with the post-graft latencies test scores of the inhibitory avoidance task ( $r=0.644$ ,  $p<0.003$  for fifteen days; and  $r=0.720$ ,  $p<0.01$  for sixty days), whereas no significant correlation was found between the GAD and the test scores ( $r=0.174$ , for fifteen days).

Similarly to GAD, the ANOVA for dopamine values (fig. 2) revealed that at both 15 and 60 days post-graft, the striatal and mesencephalic grafts had no differences between them, but both showed significantly lower concentration when compared with their control groups ( $F_{2,19}=36.478$ ,  $p<0.01$  for 15 days grafts;  $F_{2,45}=36.018$ ,  $p<0.01$  for 60 days grafts). These values showed no correlation with the test latency scores ( $r=0.066$ , for fifteen days;  $r=0.111$ , for sixty days).

#### FIGURE 2 ABOUT HERE

In a previous study (22) we found that striatal, but neither mesencephalic nor cortical grafts, can promote the recovery of inhibitory avoidance task at 60 days post-graft in striatal lesioned rats. It was also shown that lesioned animals were unable to promote the recovery of the ability to acquire the same task at 60 days after the lesion, even with two acquisition sessions (22). Other authors have reported that in rats with ibotenate-lesioned striatum, striatal and mesencephalic grafts can promote the recovery of a variety of behaviors (11, 20, 29), such as skill paw reaching (10, 28), spatial alternation learning and T-maze (7, 16), or motor activity (25,26). In these reports functional recovery was observed at times over two months post-graft and it is stated that connectivity of the grafts is important for the recovery of functional deficits (5, 29). In our model, 15 days after implantation are enough to induce the recovery of the ability to

acquire the passive avoidance. In our view at this time (15 days), it is improbable that the graft can establish a complete reactivity with the host tissue(13).

Cholinergic neurotransmission has been considered an important system related with learning and memory functions (8). We have recently shown that acetylcholine plays an important role in the recovery of conditioned taste aversion in insular cortex lesioned rats (12). With regard to the striatum, some reports have shown that the scopolamine-induced cholinergic blockade of the dorsal area of the striatum induces deficits in the acquisition of inhibitory avoidance (2, 23). The present experiments also suggest a cholinergic involvement in the recovery, since striatal grafts induce recovery of the behavioral task and possess ChAT activity similar to control tissue, whereas the mesencephalic grafts did not induce recovery and had low levels of ChAT activity. In fact, a significant correlation of ChAT activity and behavioral recovery was found. It remains to be determined what is the precise role of acetylcholine in the functional recovery induced by fetal striatal grafts.

In contrast, no significant correlation was found for graft GAD activity and dopamine graft content with the behavioral recovery. Although by no means this indicates that GABA or dopamine are not related to the functional activity of the striatum. In fact, these two neurotransmitters have been related to the striatal graft-promoted recovery of motor activity (15, 21, 30). Thus, the involvement of other neurotransmitter systems or other factors in the recovery of function cannot be dismissed.

In summary, the present findings suggest that, in our experimental model, early recovery of a behavioral function after transplantation can occur, and this recovery seems to be correlated with the activity of ChAT in the striatal grafts.

Aknowledgments: DGPA IN 204689, IN 201893 and CONACyT 0178-N9107.

We thank M.S. Juan Carlos López García for his contribution and Mr. Oreste

• Carbajal for his technical assistance.

## REFERENCES

1. Albers RW, Brady RD. The distribution of glutamic acid decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J Biol Chem* 1959; 234:926-928.
2. Bermúdez-Rattoni F, Mújica-González M, Prado-Alcalá RA. Is cholinergic activity of the striatum involved in the acquisition of positively-motivated behaviors? *Pharmacol Biochem Behav* 1986; 24:715-719.
3. Björklund A, Stenevi U. Intracerebral neural implants: neural replacement and reconstruction of damaged circuitries. *Ann Rev Neurosci* 1984; 7:279-308.
4. Björklund A, Lindvall O, Isacson O, Brundin P, Victorin K, Strecker RE, Clarke DJ, Dunnett SB. Mechanisms of action of intracerebral neural implants: studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum. *Trends Neurosci* 1987; 10:509-516.
5. Björklund A. Neural transplantation: an experimental tool with clinical possibilities. *Trends Neurosci* 1991; 14(8): 319-322.
6. Cassel JC, Kelche C, Majchrzak M, Will BE. Factors influencing structure and function of intracerebral grafts in the mammalian brain: a review. *Rest Neur Neurosci* 1992; 4:65-96.
7. Deckel AW, Moran TH, Robinson RG. Behavioral recovery following kainic acid lesions and fetal implants of the striatum occurs independent of dopaminergic mechanisms. *Brain Res* 1986; 363:383-385
8. Decker MW, McGaugh JL. The role of interactions between the cholinergic and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* 1991; 7:151-168.

9. Dunnett SB, Isacson O, Sirinathsinghji DJS, Clarke DJ, Björklund A. Striatal grafts in the ibotenic acid-lesioned neostriatum: functional studies. In: Gash DM, Sladek JR, eds, Transplantation into the mammalian CNS, Progr Brain Res. Amsterdam: Elsevier 1988; 39-45.
10. Dunnett SB, Isacson O, Sirinathsinghji DJS, Clarke DJ, Björklund A. Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions: recovery from dopamine dependent asymmetry and deficits in skilled paw reaching. *Neuroscience* 1988; 24:813-820.
11. Dunnett SB. Functional analysis of neural grafts in the neostriatum. In: Björklund A, Aguayo AJ, Ottosson D, eds, Brain Repair: Wenner-Gren International Symposium Series. London: McMillan 1990; 355-373.
12. Escobar ML, Jiménez N, López-García JC, Tapia R, Bermúdez-Rattoni F. Nerve growth factor with insular cortical grafts induces recovery of learning and reestablishes graft choline acetyltransferase activity. *J Neur Transplant Plast* (in press).
13. Fernández-Ruiz J, Escobar ML, Piña AL, Díaz-Cintra S, Cintra-McGlone FL, Bermúdez-Rattoni F. Time-dependant recovery of taste aversion learning by fetal brain transplants in gustatory neocortex-lesioned rats. *Behav Neur Biol* 1991; 55:179-193.
14. Fonum F. A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J Neurochem* 1975; 24: 407-409
15. Horrellou P, Marlier L, Privat A, Mallet J. Behavioral effects of engineering cells that synthesize L-DOPA or dopamine after grafting into the rat neostriatum. *Eur J Neurosci* 1990; 2:116-119
16. Isacson O, Dunnett SB, Björklund A. Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:2782-2792.

17. López-García JC, Bermúdez-Rattoni F, Tapia R. Release of acetylcholine,  $\gamma$ -aminobutyrate, dopamine and glutamate and activity of some related enzymes in rat gustatory neocortex. *Brain Res* 1990; 523:100-104.
18. López-García JC, Fernández-Ruiz J, Bermúdez-Rattoni F, Tapia R. Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by neocortex grafts. *Brain Res* 1990; 523:105-110.
19. Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
20. Norman AB, Lehman MN, Sanberg PR. Functional effects of fetal striatal transplants. *Brain Res Bull* 1989; 22:163-172
21. Mogenson GJ, Nielsen MA. Evidence that an accumbens to subpallidal GABAergic projection contributes to locomotor activity. *Brain Res Bull* 1983;11:309-314.
22. Piña AL, Ormsby CE, Bermudez-Rattoni F. Differential recovery of inhibitory avoidance learning by striatal, cortical and mesencephalic fetal grafts. *Behav and Neur Biol* (in press).
23. Prado-Alcalá RA. Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory?. *Life Sci* 1985;37:2135-2142.
24. Sanberg PR, Calderon SF, Garver DL, Norman AB. Brain tissue transplants in an animal model of Huntington's disease. *Psychopharmacol Bull* 1987; 23:476-482.
25. Sanberg PR, Henault MA, Deckel AW. Locomotor hyperactivity: effects of multiple striatal transplants in an animal model of Huntington's disease. *Pharmac Biochem Behav* 1986; Suppl. 25:297-301



26. Sanberg PR, Giordano M, Henault MA, Nash DR, Ragozzino ME, Hagenmayer-Hauser SH. Intraparenchymal striatal transplants required for maintenance of behavioral recovery in an animal model of Huntington's disease. *J Neural Transpl* 1989; 1:23-31.
27. Taylor RB, Reid R., Kendle KE, Geddes C, Curles PF. Assay procedure for the determination of biogenic amines and their metabolites in rat hypothalamus using ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromat* 1983; 277:101-114.
28. Valousková V, Brachá V, Bures J, Hernández-Mesa N, Marcias-Gonzalez R, Mazurova Y, Nemecek S. Unilateral striatal grafts induce behavioral and electrophysiological asymmetry in rats with bilateral kainate lesions of the caudate nucleus. *Behav Neurosci* 1990; 104:671-680.
29. Wictorin K. Anatomy and connectivity of intrastriatal striatal transplants. *Progr in Neurobiol* 1992; 38: 611-639.
30. Wolff JA, Fisher LJ, Xu L, Jinnah HA, Langlais PJ, Iuvone M, O'Malley KL, Rosenberg MB, Shimohama S, Friedmann T, Gage FH. Grafting fibroblasts genetically modified to produce L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:9011-9014.

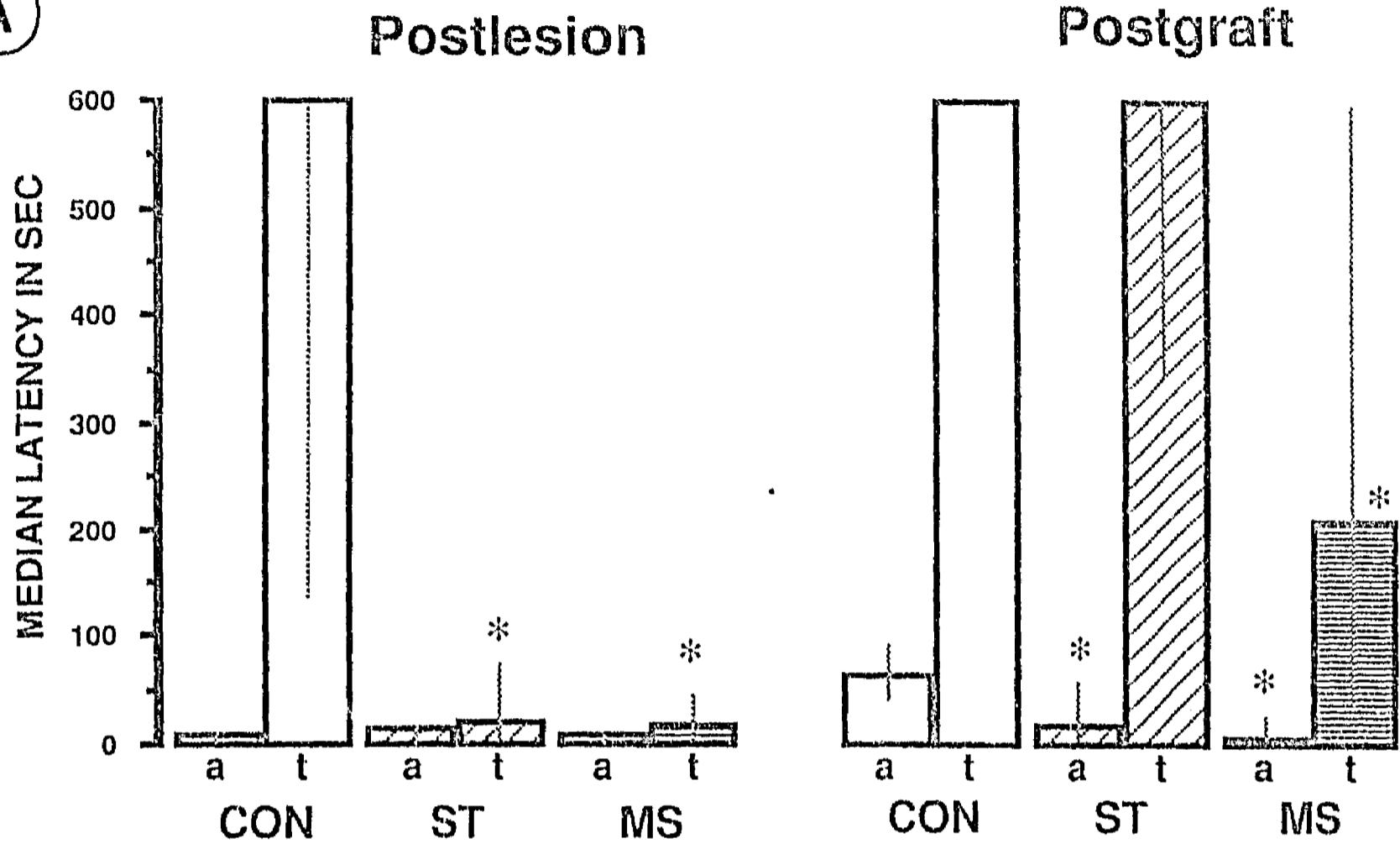
## FIGURE LEGENDS

FIGURE 1 Post-lesion and post-graft inhibitory avoidance performance at fifteen (1A) and sixty (1B) days after transplantation. The first bar of each pair represents the latency for the acquisition (a) session, and the second bar of each pair represents the latency for the test (t) session. Control (CON) and experimental groups: striatal (ST), mesencephalic (MS). [ $*p < 0.01$  (Mann-Whitney U-test)] as compared with the control groups. Dotted lines indicate interquartile range.

FIGURE 2 ChAT and GAD activities and dopamine (DA) content in striatal and mesencephalic grafts as percent of the control. (2A) Results for fifteen days. (2B) Results for sixty days.  $*p, 0.01$  lower than control and  $\diamond p, 0.01$  higher than control (Fisher test). The absolute control values were for ChAT: CON-15,  $47.0 \pm 9$  nmol/mg prot/h; CON-60,  $66.8 \pm 17.8$  nmol/mg prot/h. For GAD activity:  $211 \pm 49$  nmol/mg prot/h. For DA: CON-15,  $3.866 \pm 0.8$   $\mu$ g/g wet tissue; CON-60,  $3.5 \pm 0.5$   $\mu$ g/g wet tissue.

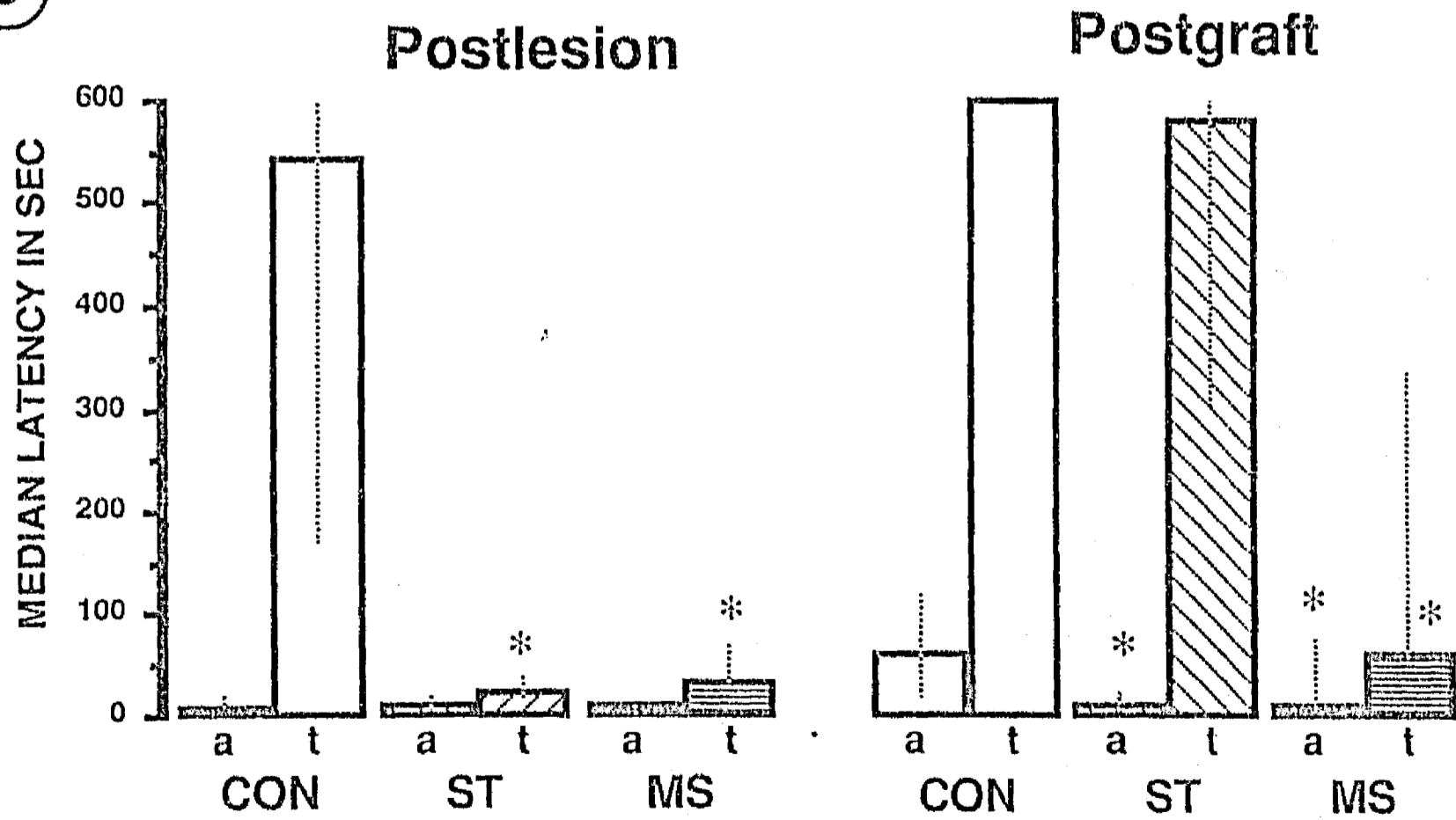
Fifteen day old grafts

1A



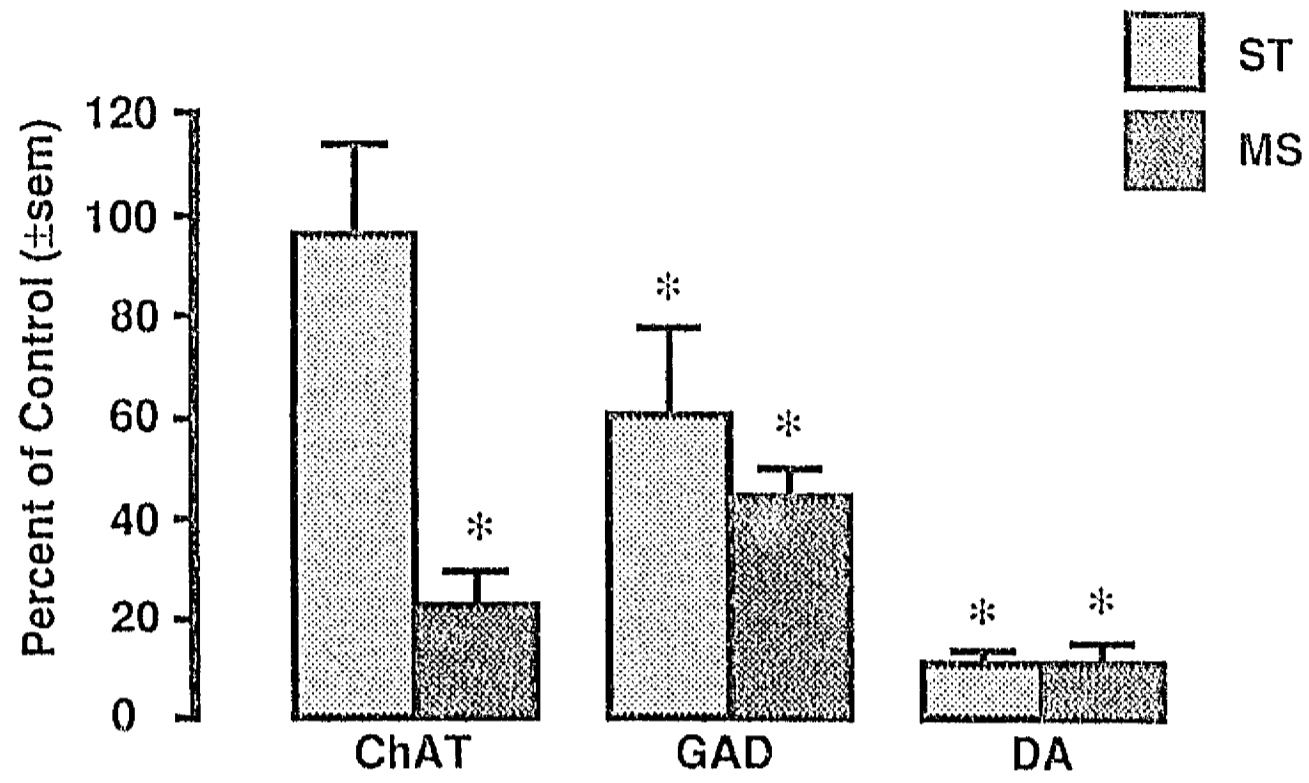
Sixty day old grafts

1B



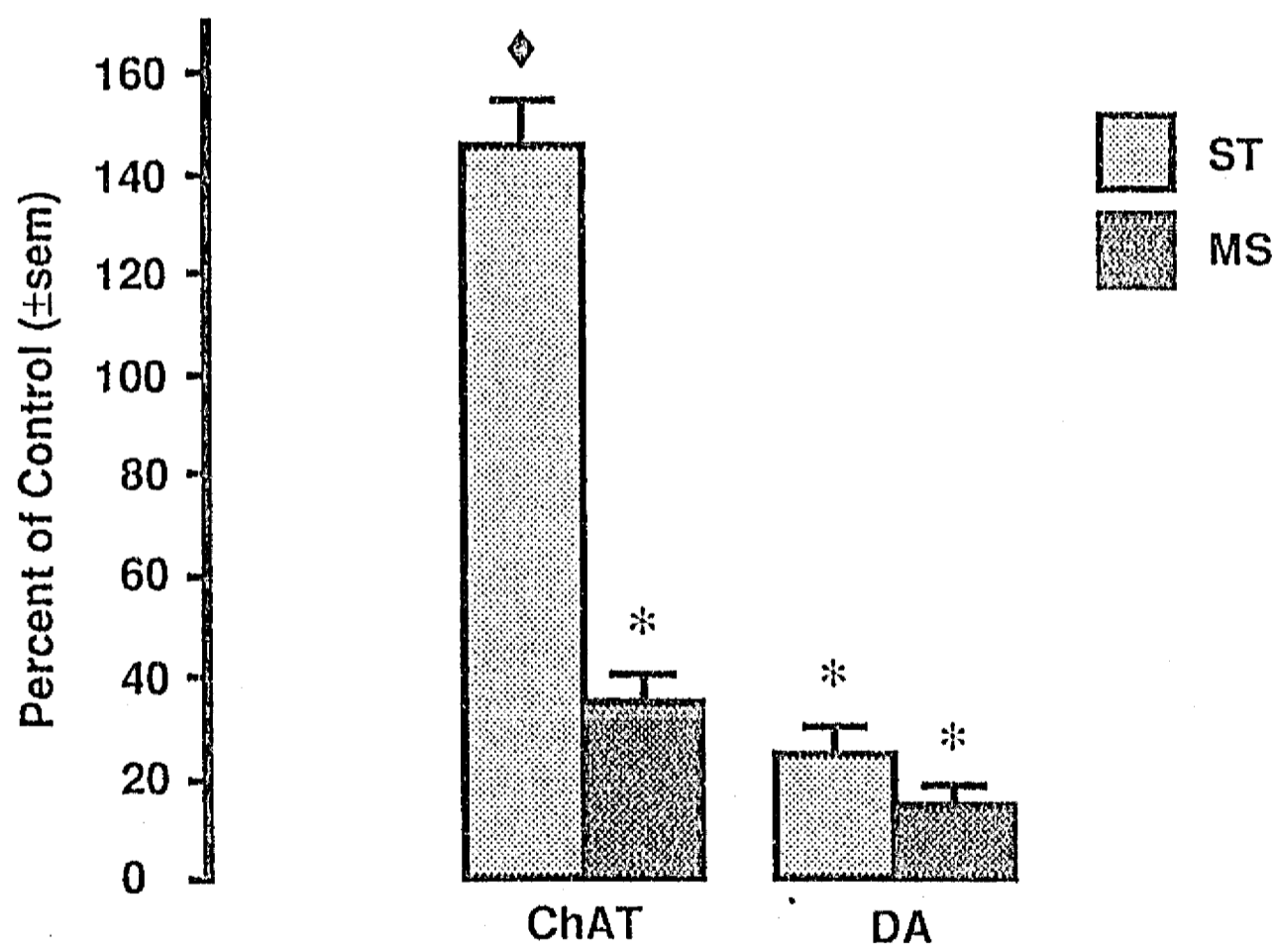
2A

Fifteen day old grafts



2B

Sixty day old grafts



**TRABAJO IV**

EL PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL EN LA  
RECUPERACION DE LA PREVENCIÓN PASIVA EN RATAS CON  
LESIONES ESTRIATALES

Nicolás Jiménez, Ana Luisa Piña, Ricardo Tapia, Federico Bermúdez-  
Rettori

TESIS CON  
FALLA DE CONTENIDO

## EL PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL EN LA RECUPERACION DE LA PREVENCIÓN PASIVA EN RATAS CON LESIONES ESTRIATALES

Con los trabajos II y III de esta tesis, hemos demostrado que las lesiones electrolíticas bilaterales producen un bloqueo en la adquisición de la prevención pasiva, y que este impedimento es revertido por la aplicación de transplantes de tejido estriatal. La recuperación puede ser observada desde los 15 días después de la aplicación del trasplante. Tanto el análisis histológico como el bioquímico indican que estos transplantes estriatales contienen acetilcolina, medida indirectamente por la actividad de la enzima colina acetiltransferasa y por la reacción histoquímica de colinesterasa. Esta recuperación temprana sugiere que los transplantes juegan, en este modelo, un papel de mediador químico, en primera instancia, y que es probable que en etapas más avanzadas, el tejido transplantado sea un mediador anatómico. Con estos resultados se sugiere además que la acetilcolina juega un papel importante en la recuperación mediada por los transplantes estriatales. Esta última idea se ve apoyada por experimentos de otros autores (Prado, 1985) que demuestran el papel que juega la acetilcolina en la adquisición de tareas condicionadas mediadas por el estriado dorsal.

Por otro lado, es conocido que el Factor de Crecimiento Neuronal (FCN), juega un papel importante en el mantenimiento, protección y regeneración neuronal (Varon, 1985; Escobar, 1993). Asimismo, ha sido ampliamente demostrado que el FCN incrementa la recuperación de algunas áreas del sistema nervioso central (SNC) lesionadas e induce el incremento de niveles de colina acetiltransferasa, enzima de síntesis de la acetilcolina, tanto en el cerebro anterior, hipocampo y en el estriado, de lo cual, y aunado a numerosas

evidencias en este sentido se deduce su participación en el sistema colinérgico del SNC (Hagg, et al., 1989, 1990; Motti et al, 1989; Varon, et al, 1989; Whitemore y Seiger, 1987, ).

En el trabajo VI de esta tesis, se demuestra que el FCN es un acelerador en la respuesta de recuperación del condicionamiento aversivo a los sabores en ratas con lesiones en la corteza insular. Como se puede observar en este trabajo, la presencia del FCN, facilita la tarea de recuperación promovida por el tejido cortical transplantado, mientras que la presencia del factor por sí sólo no revierte los efectos de las lesiones de la neocorteza insular. La mayor parte de los trabajos publicados hasta ahora, indican que la sólo presencia del factor, propicia la recuperación funcional.

Trabajos preliminares en nuestro laboratorio, indicaron que la implantación de gelfoam embebido en FCN, podían revertir el efecto de las lesiones electrofónicas bilaterales sobre la prevención pasiva.

Es propósito de este trabajo, es dilucidar el papel que tiene el FCN en la recuperación de la prevención pasiva en ratas con lesiones estriatales.

## METODOLOGIA

Ratas macho Wistar, entre 300 y 350g de peso, fueron divididas en tres grupos, un grupo que permaneció como control intacto (CON), otro grupo fue sometido a una operación de lesión simulada (SHAM) y otro como grupo lesionado. Las lesiones se realizaron bilateralmente con N-Metil-D-Aspartato (NMDA; 1 µl, 10µg/ml en salina 0.15M) en el área dorsal del estriado (coordenadas estereotáxicas, anteroposterior 0.5mm, lateral ±3.5mm, profundidad -5.5mm).



Después de 15 días, las ratas del grupo lesionado fueron divididas en tres subgrupos, un grupo (FCN) fue implantado con Gelfoam embebido en una solución de FCN (20µg/ml en medio mínimo esencial o DMEM) , a otro grupo (DMEM) se le implantó gelfoam embebido en DMEM, otro grupo (LX) permaneció lesionado, y finalmente al grupo sham se le sometió de nuevo a una operación falsa. Quince días después de realizados los implantes, todos los grupos fueron sometidos a la adquisición y prueba del condicionamiento de prevención pasiva (ver artículos I y II). Además de la técnica habitual de medición de latencias de entrada al lado obscuro de la caja de prevención pasiva, se realizaron mediciones de latencia de estancia en el lado claro de la misma caja.

Se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas para las mediciones de latencia de entrada para la prevención pasiva (para las comparaciones entre grupos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, y una prueba post-hoc de dos colas, U de Mann-Whitney, para comparación entre grupos).

## RESULTADOS

Durante la sesión de adquisición no hubo diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.05$ ) (Figura 1A). Durante el día de la prueba el análisis reveló diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.01$ ). Los grupos CON, FCN y SHAM mostraron las latencias más altas y no mostraron diferencias estadísticas entre ellas. Los grupos DMEM y LX mostraron un impedimento en el aprendizaje, con latencias significativamente bajas en comparación con los

grupos CON, FCN y SHAM ( $p$ 's < 0.05). Sin embargo el grupo DMEM mostró una latencia ligeramente mayor al grupo LX.

El análisis de los datos para la estancia en el lado ciego de la caja de prevención pasiva, indicó que los grupos CON, FCN y SHAM permanecieron por un período de tiempo más prolongado que los grupos LX y SHAM (Figura 1B). Existen diferencias significativas entre los grupos ( $p$  < 0.01) y los grupos CON, FCN y SHAM mostraron latencias significativamente más altas que los grupos LX y DMEM ( $p$ 's < 0.05).

## DISCUSION

Estos resultados indican que el factor de crecimiento neuronal aplicado en ratas con lesiones estriatales, promueve la recuperación de la adquisición de la prevención pasiva. No existen evidencias de recuperación espontánea por parte de las ratas que permanecieron lesionadas o aquellas que recibieron únicamente el vehículo, es decir, el medio mínimo esencial (DMEM).

Resultados similares han sido descritos en los que el FCN administrado ya sea en forma aguda (Kesslak et al., 1986; Will y Hefti, 1985, Hefti 1986) o en forma crónica (Varon et al, 1989) en diferentes regiones del sistema nervioso, promueve la recuperación de diversos tipos de aprendizaje. En todos estos casos la observación de recuperación funcional ha sido descrita a largo plazo, esto es, con más de un mes de ser aplicado el FCN. En nuestro caso, podemos observar recuperación quince días después de administrado el FCN en forma aguda (una sola aplicación en gelfoam embebido en la solución de FCN). Además de observar recuperación en la adquisición de la prevención pasiva, datos no mostrados en esta tesis, indican que otros tipos de condicionamiento como lo es el laberinto de agua de Morris (water maze), también son afectados

por las lesiones del estriado dorsal con NMDA y que en estos casos también se puede observar el efecto de la recuperación promovida por el factor de crecimiento.

Nuestros resultados apoyan ampliamente las tesis de que el FCN actúa como rehabilitador y protector neuronal. A este respecto, los trabajos del grupo de Gash han demostrado que implantes estriatales (Perlman et al., 1991) o implantes de gelfoam (Perlman et al., 1993) protegen a las neuronas colinérgicas estriatales, contra el daño producido por ácido quinolínico administrado después de aplicado el implante. Estos datos sugieren que la lesión producida al introducir el implante podría estar generando una mayor disponibilidad de factores tróficos, como ya ha sido demostrado ampliamente (Niello-Sampedro y Cotman, 1986). Así pues la administración de FCN ya sea en forma aguda (Davis y Beardsall, 1992) o en forma crónica (Vahlsing et al., 1991; Schumacher et al., 1991; Maysinger et al., 1992; Frim et al., 1993) en el estriado promueve protección a la muerte neuronal, además de recuperación conductual.

Como se sabe, los efectos del FCN han sido relacionados específicamente con células colinérgicas del SNC (Hefti, 1985). A este respecto se ha demostrado que el FCN es un protector específico de células colinérgicas (Frim et al., 1993; Davies y Beardsall, 1992). En nuestro modelo, el análisis preliminar de datos histológicos (histoquímica para colinesterasa) y bioquímicos (actividad de la colina acetiltransferasa, CAT), sugieren que la recuperación conductual que observamos en animales con implantes de gelfoam con NGF, esta relacionada con la actividad colinérgica de estas neuronas. Estos datos, aunados a los ya encontrados en estudios previos en nuestro laboratorio (Piña et al., 1993a y b) y por otros autores (Prado et al., 1985; Bermúdez-Rattoni et al., 1986), sugieren que la acetilcolina juega un papel preponderante en la función estriatal con respecto a ciertas tareas condicionadas.

Nuestro trabajo, entonces, demuestra que el FCN administrado de manera aguda en sujetos con lesiones excitotóxicas en el estriado dorsal, promueve la recuperación de la prevención pasiva, y de actividad del sistema colinérgico en el tejido huésped.

### PIE DE FIGURA

FIGURA 1. Resultados de prevención pasiva en ratas cuya prueba se efectuó quince días después del implante. **(1A)** latencia de entrada al lado obscuro de la caja de prevención pasiva. La primera barra de cada par representa la latencia en la sesión de adquisición. La segunda barra de cada par representa la latencia de entrada durante la sesión de prueba. **(1B)** Latencia de estancia en el lado claro de la caja de prevención pasiva. Los grupos CON (control), SHAM (con operación falsa), DMEM (gelfoam embebido en medio mínimo esencial), LX (sujetos que permanecieron lesionados), FCN (sujetos que recibieron gelfoam embebidos en factor de crecimiento neuronal). Las líneas en cada barra representan los rangos intercuartiles. \* ( $p < 0.01$ ) (U de Mann-Whitney), en comparación con el grupo control.

## REFERENCIAS

- Bermúdez-Rattoni F., Mújica-González M., Prado-Alcalá R.A. Is cholinergic activity of the Striatum involved in the acquisition of positively-motivated behaviors? *Pharmac. Biochem. and Behav.* 24 (1986) 715-719.
- Davies S.W., Bearsall K. Nerve growth factor selectively prevents excitotoxin induced degeneration of striatal cholinergic neurones. *Neuroscience Letters* 140 (1992) 161-164.
- Escobar M.L. El factor del crecimiento neuronal en el sistema nervioso central. *Ciencia* (en prensa) (1993).
- Frimm D.M., Short M.P., Rosenberg W. S., Simpson J., Breakfield X.O., Isaacson O. Local protective effects of nerve growth factor-secreting fibroblasts against excitotoxic lesions in the striatum. *J. Neurosug.* 78 (1993) 267-273.
- Hagg T., Manthorpe M., Vahlsing H.L., Varon S. Nerve growth factor roles for cholinergic axonal regeneration in the adult mammalian central nervous system. *Comments Dev. Neurobiol.*, 1, (1990), 157-173.
- Hagg T., Vahlsing H.L., Manthorpe M., Varon S. Septo-hippocampal cholinergic axonal regeneration through peripheral nerve bridges: quantification and temporal development. *Exp. Neurol.*, 109 (1990) 153-163.
- Hefti F., Hartikka J., Knusel B. Function of neurotrophic factors in the adult and aging brain and their treatment of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging*, 10, (1989), 515-533.
- Hefti F. Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after transections. *J. Neurosci.* 6 (1986) 2155-2162.
- Kesslak J.P., Brown L., Steichen C., Cotman C.W. Adult and embryonic frontal cortex transplants after frontal cortex ablation enhance recovery on a reinforced alternation task. *Exp. Neurol.* 94 (1986) 615-656.
- Nieto-Sampedro M., Cotman C.W. Growth factor induction and temporal order in CNS repair. En C.W. Cotman (Ed.), Gifford, New York, (1986), 407-456.
- Maysinger D., Herrera-Marschitz M., Gojny M., Ungersted U., Cuervo A.C. Effects of nerve growth factor on cortical and striatal acetylcholine and dopamine release in rats with cortical devascularizing lesions. *Brain Res.* 577 (1992) 300-305.
- Pearlman S.H., Levivier M., Collier T.J., Sladek J., Gash D.M. Striatal implants protect the host striatum against quinolinic acid toxicity. *Exp. Brain Res.*, 84 (1991) 303-310.

Pearlman S., Levivier M., Gash D.M. Striatal implants of fetal striatum or gelfoam protect against quinolinic acid lesions of the striatum. *Brain Research* (1993). 203-211.

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

Schumacher J.M., Short M.P., Hyman B.T., Breakfield X.O., Isacson O. Intracerebral implantation of nerve growth factor-producing fibroblasts protects striatum against neurotoxic levels of excitatory amino acids. *Neuroscience* Vol. 45 (1991) 561-570.

Vahlsing H.L., Hagg T., Spencer M., Conner J.M., Manthorpe M., Varon S. Dose-dependent responses to nerve growth factor by adult rat cholinergic medial septum and neostriatum neurons. *Brain Res.* 552 (1991) 320-329.

Varon S., Hagg T., Manthorpe M. Neuronal growth factors. En: F.J. Soil (Ed.) *Neural regeneration and transplantation. Frontiers in Clinical Neurosciences*, Vol. 6, Alan Liss. New York, (1989a), pp 101-121.

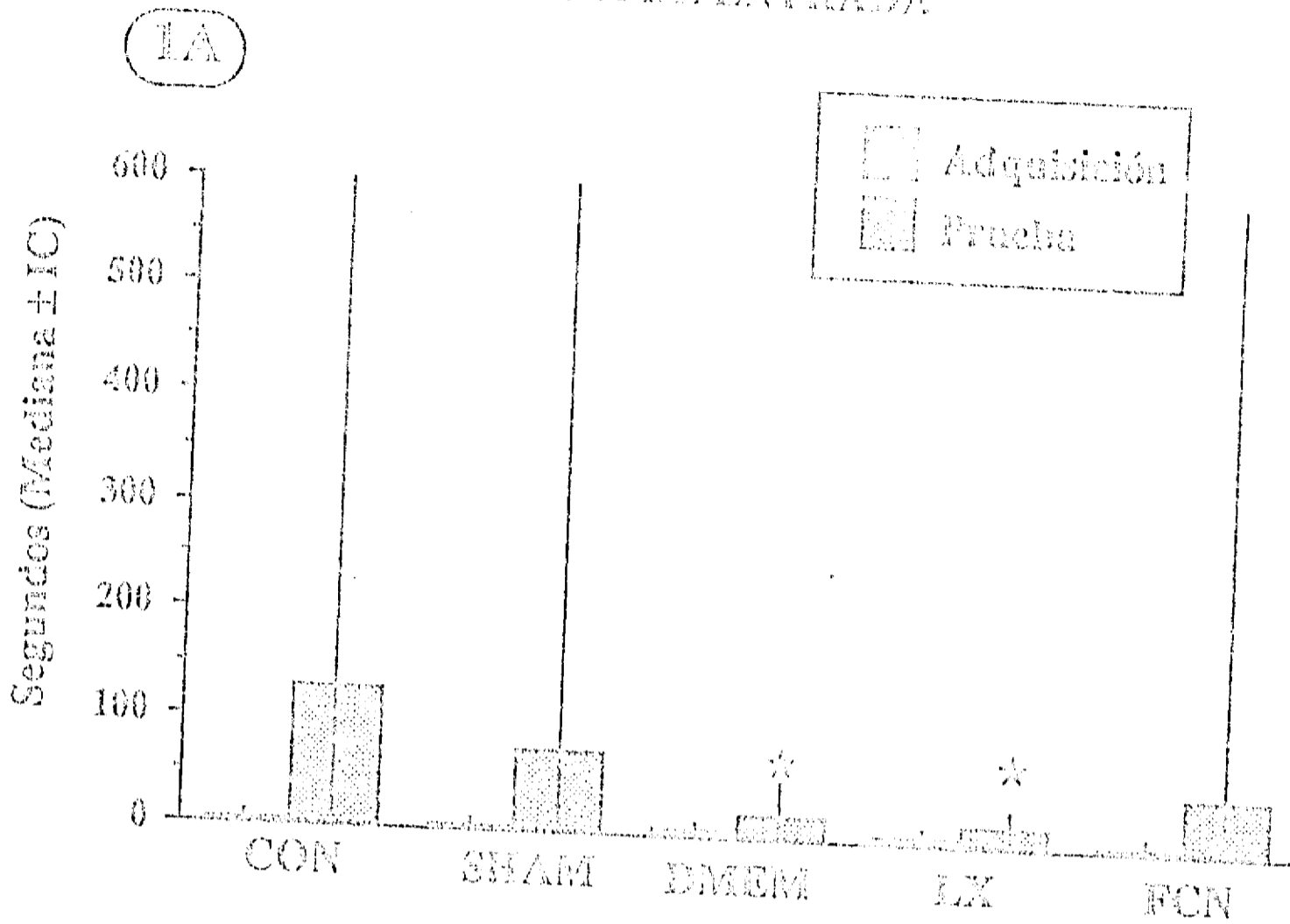
Varon S., Hagg T., Vahlsing L., Manthorpe M. Nerve growth factor in vivo actions on cholinergic neurons in the adult rat CNS. En: *Cell function and disease*. L.E. Canedo, L.E. Todd., L. Packer, J. Jaz. Plenum press. (1989b) 235-248.

Whittemore S.R., Seiger A. The expression, localization and functional significance of  $\beta$ -nerve growth factor in the central nervous system. *Brain Res. Rev.*, 12 (1987) 439-464.

Will B., Hefti F. Behavioral and neurochemical effects of chronic intraventricular injections of nerve growth factor in adult rats with fimbrial lesions. *Behav. Brain. Res.* 17 (1985) 17-24.

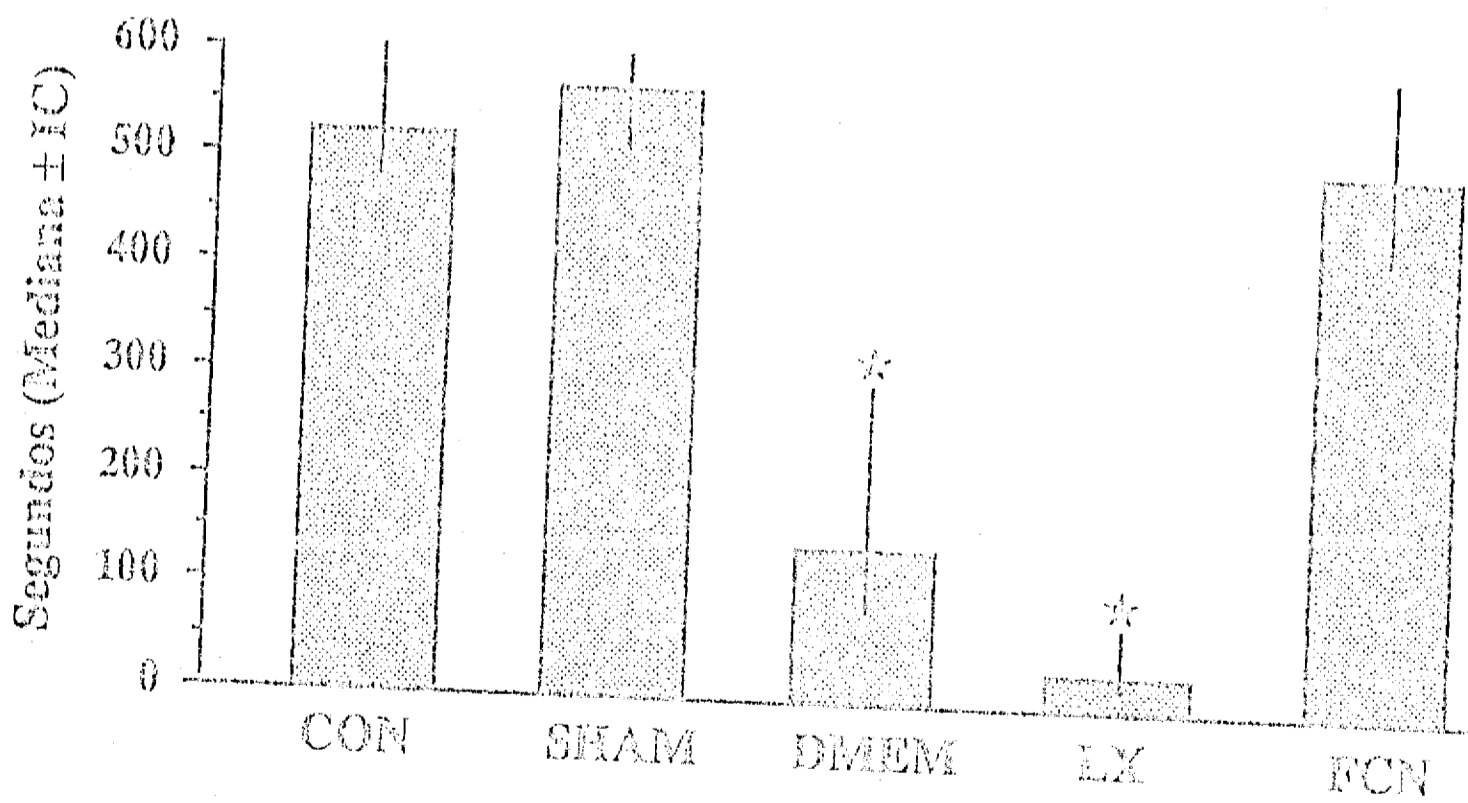
# PREVENCIÓN PASIVA

## LATENCIA DE ENTRADA



IB

## ESTANCIA EN LADO CLARO



## CONTRIBUCIÓN DEL ESTRIADO A LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL DEL ESTRIADO

Los implantes tanto de tejido cerebral fetal, como de factor de crecimiento neuronal (FCN) en el estriado lesionado, han constituido un modelo experimental sólido, por medio del cual ha sido posible correlacionar tanto la plasticidad funcional del tejido cerebral adulto, como la fisiología de una estructura tan compleja como lo es el estriado.

Con nuestros trabajos hemos demostrado que las lesiones bilaterales tanto electrofísicas como químicas con la excitotoxina NMDA, producen un impedimento en la adquisición del condicionamiento de prevención pasiva. Que este impedimento, es revertido por trasplantes de tejido estriatal fetal o por implantes de gelificam embebidos en FCN y que estos efectos pueden observarse a partir de los 15 días posteriores al implante. Nuestros trabajos también muestran que los trasplantes de tejido estriatal poseen actividad de colina acetiltransferasa (CAT, enzima de síntesis de la acetilcolina), y que el tejido estriatal adyacente a los implantes con FCN parecen poseer actividad elevada de CAT (datos preliminares no mostrados en esta tesis). Esto sugiere que la acetilcolina juega un papel importante en la recuperación funcional.

Nuestros datos muestran que las lesiones, tanto electrofísicas como las excitotóxicas bilaterales de la porción dorsal de la cabeza del estriado, producen un deterioro en la adquisición del aprendizaje de la prevención pasiva. Esto concuerda con los resultados de varios autores (Wyers, 1968; Winocur, 1974; Prado-Alcalá, 1973, 1980; Koide et al., 1983), en los que diversos tipos de lesiones del estriado producen un impedimento marcado en el aprendizaje de diversas tareas instrumentales, y entre estas, la prevención pasiva.



Por otro lado, los trasplantes de tejido cerebral fetal promovieron una recuperación selectiva. Los trasplantes estriatales, no así los trasplantes mesencefálicos o los corticales, promovieron la recuperación de los animales lesionados. A este respecto existen varios autores que han probado que los trasplantes estriatales promueven la recuperación de diversos tipos de aprendizaje (Lecourt et al., 1994 y 1998, Kojima et al., 1999). La mayor parte de estos reportes, hacen mención de observar recuperación en tiempos post-trasplante mayores a un mes. En nuestro caso, los tiempos post-trasplante de 15 días con éxito en la recuperación, sugieren que el trasplante en este caso, más que un puente anatómico (ya que a los 15 días se piensa en una incipiente recuperación citoarquitectónica) pudiera constituir una fuente de factores solubles que promuevan la recuperación. A este respecto en estudios preliminares en nuestro laboratorio, al administrar el trazador retrógrado fluorogold, en la parte reticulata de la sustancia nigra en sujetos con trasplantes estriatales, se observó ausencia de células marcadas con fluorogold en los trasplantes estriatales de 15 días de maduración; en cambio en los trasplantes estriatales de 30 y 60 días de maduración sí se pudieron observar células marcadas con fluorogold dentro del trasplante.

El análisis histológico y bioquímico, como ya hemos mencionado, sugiere que la acetilcolina constituye un neurotransmisor cuya presencia correlaciona con la recuperación conductual. Como se menciona desde el trabajo II, el papel de la acetilcolina en el estriado, en relación a la adquisición de la prevención pasiva (Prado-Alcalá, 1985; Bermúdez-Raltoni, 1986) es bien conocida. Por supuesto que al hablar de estriado no podemos descartar el papel que juegan otros neurotransmisores como la dopamina o el GABA. A este respecto nosotros, encontramos niveles bajos de la actividad de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) y niveles bajos de dopamina en los trasplantes

estriatales y mesencefálicas (trabajo III). Asimismo, al hacer el análisis del tejido estriatal huésped (datos no mostrados en esta tesis), no encontramos ninguna diferencia en cuanto a niveles de dopamina, entre los tejidos de controles intactos y los que habían recibido transplantes. Si bien el sistema dopaminérgico estriatal ha sido relacionado con la actividad motora al igual que el sistema GABAérgico (Wictoria, 1992; Liu et al., 1992), en nuestro modelo lo que podemos decir es que el papel de estos neurotransmisores no está bien dilucidado.

Los resultados hasta aquí expuestos, muestran el papel de la acetilcolina en el proceso de aprendizaje de sujetos con lesiones estriatales. Numerosos son los estudios, principalmente farmacológicos, que han sugerido reiteradamente el papel de la acetilcolina en un gran número de funciones cerebrales, incluyendo el aprendizaje y la memoria (Dunnett et al., 1985). Por otro lado el FCN, parece ejercer sus efectos sobre neuronas colinérgicas del SNC (Hefti, 1986). Utilizando implantes de gelfoam embebidos en FCN hemos demostrado que sujetos con lesiones químicas, pueden recuperar la habilidad para aprender el condicionamiento de prevención pasiva, 15 días posteriores al implante. El análisis bioquímico preliminar del estriado huésped de estos animales con implantes con FCN, indican que la actividad de CAT se encuentra en niveles similares con respecto a aquellos encontrados en ratas controles intactas. Esto nos sugiere que el FCN está promoviendo la recuperación funcional a través de la reactivación sobre el sistema colinérgico estriatal. También existe una explicación alternativa: que el FCN ejerza acciones tróficas sobre regiones distintas al estriado, con lo que tendríamos un efecto de plasticidad a distancia, como se ha postulado por otros autores (Prado-Alcalá, 1993). Esto es que la función que el estriado tiene en relación a la prevención pasiva se refiere, sea diferida a alguna(s) otra(s) estructura(s). Sin embargo la dilucidación del

mecanismo preciso por el cual el FOM está ejerciendo su efecto de recuperación  
en este modelo requiere de investigación adicional.

**TRANSPLANTES CORTICALES**

TRABAJO V

## Time-Dependent Recovery of Taste Aversion Learning by Fetal Brain Transplants in Gustatory Neocortex-Lesioned Rats

J. FERNÁNDEZ-RUIZ,\* M. L. ESCOBAR,\* A. L. PIÑA,\* S. DIAZ-CINTRA,†,  
F. L. CINTRA-McGLONE,† AND F. BERMÚDEZ-RATTONI\*,<sup>1</sup>

\**Instituto de Fisiología Celular and †Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad  
Nacional Autónoma de México*

We recently showed that fetal brain transplants produced a significant recovery in the ability of gustatory neocortex-lesioned rats to learn a conditioned taste aversion. In this report we assessed the capability of gustatory neocortex fetal brain transplants to produce behavioral recovery at different times. Four groups of male Wistar rats showing disrupted taste aversions due to gustatory neocortex lesions were studied. The lesioned animals received fetal cortical grafts, obtained from 16-day-old fetuses, and were retrained in the behavioral procedure after 15, 30, 45, or 60 days postgraft. Behavioral results showed a very good functional recuperation at 60 days, slight recovery at 45 and 30 days, and a poor recovery at 15 days postgraft. Results with HRP histochemistry revealed that at 30, 45, and 60 days postgrafting there were increased connections with the ventromedial nucleus of the thalamus and with the amygdala. At 15 days postgrafting there was an absence of HRP-labeled cells. In addition, behavioral recovery was correlated with increased acetylcholinesterase activity, detected histochemically, and with morphological neuronal maturation, revealed by Golgi staining. These results suggest that morphological maturity and reconnectivity between grafts and host tissue are important for behavioral recovery in gustatory neocortex-lesioned rats.

© 1991 Academic Press, Inc.

The fetal brain transplant technique has been used recently as a very effective tool to ameliorate functional and behavioral deficits produced by either mechanical (Kesslak, Nieto-Sampedro, Globus, & Cotman, 1986; Woodruff, Braisden, Whittington, & Benson, 1987), chemical

<sup>1</sup> This research was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant PEXCNA-050290). We thank Jorge Perez-Leon and Angeles Ortega for technical assistance, Dr. Roberto Prado-Alcala and Nan Collet for their helpful comments, and Mrs. Maria Teresa Torres for preparing the manuscript. Please address all correspondence and requests for reprints to Dr. Federico Bermudez-Rattoni, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-600, 04510 México, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

(Isacson, Dunnett, & Bjorklund, 1986; Kesslak, Walenciewicz, Calin, Nieto-Sampedro, & Cotman, 1988), or degenerative injuries to adult mammal brain (Collier, Gash, & Sladek, 1988; Fine, Dunnett, Bjorklund, & Iversen, 1985; Huang, Kissane, & Hawrylewicz, 1987).

Conditioned taste aversion (CTA) has been widely used as a model for the study of learning processes (Garcia, Lasiter, Bermudez-Rattoni, & Deems, 1985). In this model animals can acquire aversion to a taste cue (conditioned stimulus, CS) when it is followed by gastrointestinal illness (unconditioned stimulus, US). The anatomical pathways involved in CTA have been extensively studied (for review see Garcia et al., 1985; Kiefer, 1985). Briefly, the posterior ventromedial (VPM) and ventromedial nuclei (VM) of the thalamus receive afferents from the pontine taste area. These thalamic nuclei send fibers to both the gustatory neocortex and the amygdala (Kiefer, 1985; Lasiter & Glanzman, 1985); reciprocal connections between the amygdala and gustatory neocortex have recently been described (Escobar, Fernandez, Guevara-Aguilar, & Bermudez-Rattoni, 1989; Lasiter & Glanzman, 1985).

Lesions of the gustatory neocortex region (GN) in adult rats lead to a behavioral impairment in both acquisition and retention of conditioned taste aversions (Kiefer, 1985; Lasiter & Glanzman, 1985). It has been demonstrated that cortical fetal brain transplants induce recovery of taste aversion learning in rats with gustatory neocortex lesions (Bermudez-Rattoni, Fernandez, Sanchez, Aguilar-Roblero, & Drucker-Colin, 1987; Escobar et al., 1989; Yirmiya, Zhou, Holder, Deems, & Garcia, 1988).

The mechanisms by which the brain transplants produce functional recovery are not well understood. In this regard, several authors explain the behavioral improvement after fetal brain transplants in previously lesioned animals as being due to the release of "trophic" factors (Labbe, Firl, Mufson, & Stein, 1983). Other groups have pointed out that new connections between the graft and the host are responsible for the behavioral recuperation (Dunnett, Low, Iversen, Stenevi, & Bjorklund, 1982). Kesslak and co-workers (1988) reported that hippocampal but not glial transplants to adult rats produced partial recovery of a forced-choice alternation task. These results suggest that morphological recovery is necessary for the functional recovery. In agreement with this hypothesis, we recently demonstrated, using the horseradish peroxidase histochemistry technique (HRP), that cortical but not tectal brain transplants were able to produce behavioral recovery and reestablish connections with the amygdala and the ventromedial nucleus of the thalamus (Escobar et al., 1989).

Several authors have found connections between the cortical grafts and the host brain. Floeter and Jones (1985) reported that the cortical transplant projected fibers to the thalamus, the contralateral cortex, the striatum, and the hippocampus. Castro and co-workers observed that 10 months after cortical grafting, the transplanted tissue had received fibers

from the basal forebrain, locus coeruleus, and raphe (Castro, Tonder, Sunde, & Zimmer, 1988). These results clearly show that the cortical grafts are able to survive in the brain parenchyma and to establish afferent and efferent connections with the host tissue (Ebner, 1988; Escobar et al., 1989).

In the present study we report the time course of the behavioral recovery induced by gustatory neocortex transplants after GN lesions, as well as the time course of the appearance of connections with the amygdala and thalamus. In addition, we report the time course of the appearance of acetylcholinesterase reactivity and the development of grafted tissue using the Golgi staining technique.

## METHODS

### *Subjects*

Fifty-four male Wistar rats weighing 250–280 g were individually housed in Plexiglas boxes and had *ad lib* access to food and water, except during the CTA procedures (see below). The animals were kept on a strict 12:12-h light–dark cycle (08:00 h on; 20:00 h off).

### *Surgery*

Large bilateral electrolytic lesions were made under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg) to encompass the gustatory neocortex (AP = +1.2 mm, L + 5.3 mm, DV – 5 mm) in 30 experimental animals. Lesions were made by passing a direct anodal current (1 mA/60 s) through a stainless steel electrode coated with epoxy except for the cross section of the tip. Twenty-four animals were used as unoperated controls.

### *Behavioral Procedure*

Following the 7-day recovery period, the experimental and control animals were habituated to drinking their entire daily water ration in the home cages during a 10-min period in the morning and an equal period in the afternoon. This water deprivation schedule was maintained from Day 8 throughout the remainder of the experiment unless otherwise stated. The volume of water consumption was measured every day with 50-ml calibrated test tubes equipped with a rubber stopper and a glass drinking spout. Water consumption was recorded to the nearest 0.5 ml.

On Day 13 (the acquisition trial), 0.1 M LiCl was presented instead of water in the afternoon period. It has been demonstrated that the taste of LiCl can readily be aversively conditioned to its gastric aftereffects, since it is also the agent inducing illness (Nachman, 1963). The first extinction trial was given after five water intake baseline measures on Day 16 in the afternoon. Extinction trials consisted of the presentation of 0.1 M of NaCl instead of the LiCl. Two extra extinction trials (Days



18 and 20) were given, with three water intake baseline measures in between (see Bermudez-Rattoni et al., 1987). It has been demonstrated that rats cannot discriminate between the flavors of NaCl and LiCl (Nachman, 1963).

#### *Transplant Procedure*

After the behavioral tests, on Day 21 the experimental animals were divided randomly into four groups (see below) and received homotopic cortical fetal brain transplants as previously described. Briefly, 16-day-old fetuses were removed from the abdominal cavity of pregnant rats under barbiturate anesthesia (50 mg/kg). The fetal brains were removed, and the temporoparietal area (above the rhinal sulcus) was dissected under a microscope. The tissue (about 2 mm<sup>3</sup>) was aspirated into a 100- $\mu$ l Hamilton microsyringe and then stereotaxically injected into the GN area with the same stereotaxic coordinates used to make the previous lesion. The experimental animals were randomly assigned to be retrained for CTA at 15 (G15;  $n = 8$ ), 30 (G30;  $n = 8$ ), 45 (G45;  $n = 6$ ), or 60 (G60;  $n = 8$ ) days postgraft, using the same behavioral procedure described above. Control groups (C15;  $n = 6$ , C30;  $n = 6$ , C45;  $n = 6$ , C60;  $n = 6$ ) were trained in parallel.

#### *Histological Procedure*

At the end of the experiment, HRP histochemistry, acetylcholinesterase (AChE) histochemistry, and Golgi impregnation were each made in at least two rats per group.

*HRP histochemistry.* Horseradish peroxidase (Sigma VI) was dissolved in fast-green solution 2% (0.4 mg/10  $\mu$ l). Sixteen GN-grafted subjects (four from each experimental group) received a unilateral injection (0.5  $\mu$ l) of the HRP solution in the amygdala ( $n = 2$ ) or in the thalamus (VM and VPM nuclei,  $n = 2$ ) ipsilateral to the graft. In addition, two control animals from group C60 received a unilateral injection of the same solution in the amygdala and three rats from the same group received an injection in the VPM and VM nuclei of the thalamus. The injections were made stereotaxically with a 1.0- $\mu$ l Hamilton syringe. Each injection lasted 25 min and the needle was taken out 15 min after the end of the injection. After a 26-h survival period, rats were perfused transcardially with 300 ml of 1.25% glutaraldehyde and paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4), followed by 300 ml of 20% sucrose in phosphate buffer (pH 7.4); 24 h later, the brains were removed and sliced in coronal (60  $\mu$ m) sections.

The slices were processed with tetramethylbenzidine (TMB) as a chromogen, according to the Mesulam technique (Mesulam, 1982), and counterstained with thionine. The slices were subsequently examined and pho-

tographed under bright- and dark-field microscopy for the presence and location of retrogradely labeled neurons.

*Golgi stain.* Six animals from groups G60, G30, and G15 (two each) were anesthetized with pentobarbital and perfused through the heart with 10% neutral buffered formalin, and the brains were removed the following day. In each rat a 4-mm-thick coronal block of tissue including the gustatory cortex was prepared for the rapid-Golgi technique. The immersion-fixation solution consisted of 4.5% potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) and 1% osmium tetroxide in distilled water (3:1). After 10 days of fixation the solution was poured off and the tissue was drained briefly on absorbent paper, transferred to a 0.75% silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) solution, and stored in brown glass bottles. Twenty-four hours later the tissue was removed from the silver solution, drained briefly on absorbent paper, and then washed with an ethanol impregnated brush. The tissue was then gradually dehydrated with ethanol and stored for 24 h in absolute ethanol and ether. Following that, the tissue was gradually exposed to gradually more concentrated solutions of nitrocellulose (from 2 to 30%) over the course of not more than 5 days at the maximum. The blocks were embedded in low viscosity 30% nitrocellulose and hardened overnight in a container with chloroform vapors.

Serial sections were cut at 120- $\mu$ m thickness on the sliding microtome, dehydrated in ethanol (70, 80 and 95%, 10 min each), and passed through 98% isopropanol and 98% terpineol (10 min each). The sections were transferred to reagent grade xylene and mounted with synthetic resin.

*Acetylcholinesterase histochemistry.* The remainder of the animals (two from each experimental group) were anesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with the same formula described above for HRP injections. The brains were cut coronally (40  $\mu$ m thickness), mounted, and then immersed in the incubating solution described by Paxinos and Watson (1982). The following day the slices were developed in sodium sulfide (pH 5) and mounted with synthetic resin.

## RESULTS

### *Behavior*

One-way ANOVA was done on the test day consumption volume for all groups, with post hoc group comparisons, when appropriate, using the Student-Newmann-Keuls' test (Fig. 1). During the pregraft test trial, there were significant differences among groups ( $F(7, 51) = 11.4; p < .001$ ). As expected, the four control groups showed strong taste aversions in the first test trial. The experimental (GN lesions) groups showed significant disrupted taste aversions when compared with their own controls ( $p$ 's  $< .05$ ). Postgraft ANOVA comparisons (Fig. 1, right), revealed that there were significant differences among the groups ( $F(7, 51) = 6.88; p$

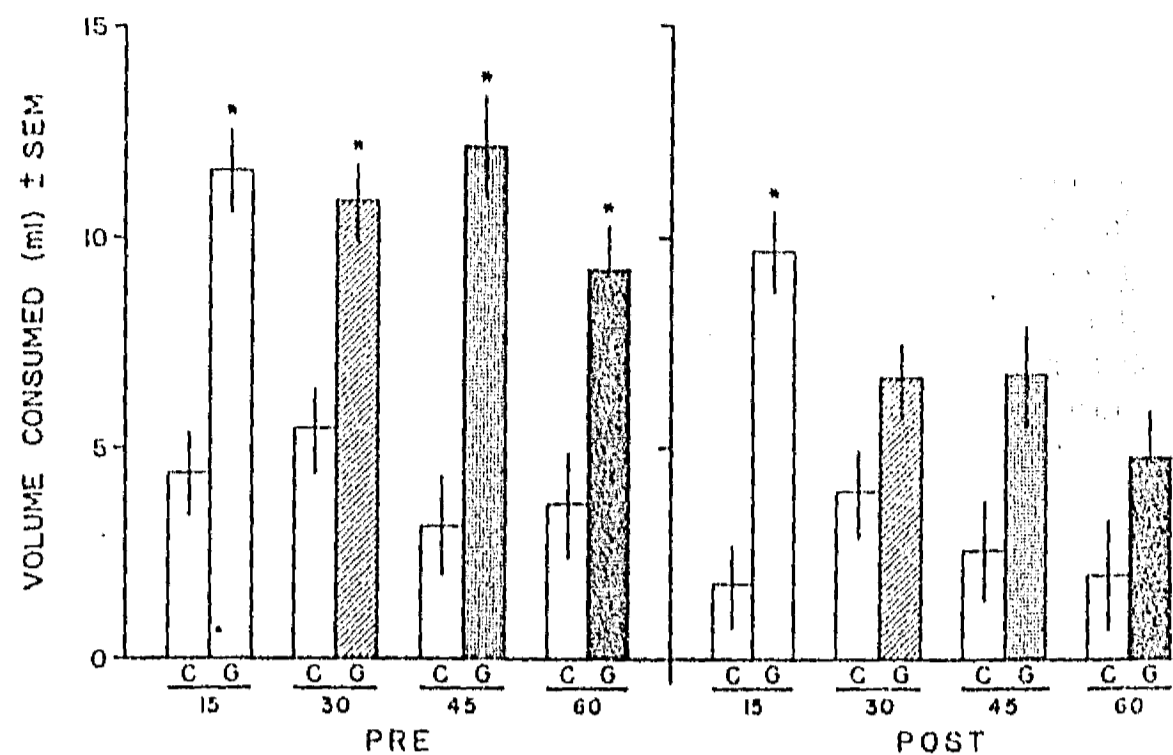


FIG. 1. The graph illustrates the amount of NaCl consumed by control (C) and grafted groups (G) pre- and postgraft. The left side shows the results from the test trial prior to transplant. The right side shows the results of one test trial after transplant for the 30-, 45-, and 60-day groups (see text). \* $p < .05$  (Newmann-Keuls test).

$< .001$ ). The control groups again showed excellent aversion. The G15 group showed a disrupted taste aversion, consuming significantly more NaCl solution when compared with its own control ( $p < .05$ ). The G30 and G45 groups consumed more saline solution than their respective control, although there were no significant differences. The G60 group showed a strong water intake suppression in the presence of the CS, which was similar to its own control.

In addition, paired  $t$  tests between pre- and postgraft volume consumption were done. The postgraft scores revealed that groups G30, G45, and G60 showed a significant aversion as they reduced their water consumption in the presence of the CS when compared with their pregraft scores ( $p$ 's  $< .05$ ). In contrast, group G15 showed a disrupted taste aversion both pre- and postgraft, as they had similar NaCl water consumptions.

#### HRP Histochemistry

The analysis of the brain tissue injected into the VPM and VM nuclei of the thalamus or amygdala with HRP in the G15 experimental animals showed that there were no HRP-labeled cells in the grafted tissue. Nevertheless, we found labeled host cells in the ipsilateral thalamus and amygdala projections of the same animals, indicating that the labeling procedure was working. In the graft tissue of G30 animals the HRP neurons were

scarcely labeled. In contrast, in the 45- and 60-day graft tissue, a great number of labeled neurons were found, though not as many as in control tissue, as we have described previously (Table 1; Fig. 2; Escobar et al., 1989). The cell distribution inside the transplant did not follow any distinguishable pattern in all the grafts in which HRP-labeled cells were found. In addition, we did not find differences in the amount of labeled cells depending upon the place where the injection was made, i.e., amygdala or thalamus.

#### *Golgi Stain*

The Golgi stain results were obtained from six adult brains with fetal brain transplants. We observed differences at each age of the transplanted tissue. The difference in the tissues taken at 15, 30, and 60 days was that they were all in different stages of neuronal development and maturation. In all experimental groups the grafted tissue showed a neural reorganization in both tissue types (grafted and host) with a greater neuronal density in the transplanted tissue, particularly in those of 60 days. In general, the fetal transplants adhered to the host tissue with abundant vascularization and great proliferation of glial cells in the transplant border as well as fibers that crossed the interface. The following chronological changes were observed. At 15 days, transplanted tissue showed scarce development of neurons and blood vessels. Round-shaped neurons appeared with few dendritic processes; some of them had no spines at all in their dendrites (Fig. 3A). There were few glial cells in the border of the transplant. In an overall view the grafts appeared to be at an initial state of neuronal development, with an incipient vascularization process between transplant and host tissue. At 30 days, graft tissue appeared to be in a more advanced stage of development (Fig. 3B). That is, neurons showed a great number of dendritic processes growing in all directions from the cell body. The axons were apparent in the majority of the neurons, and blood vessels were found in the border and inside the transplanted tissue. Many pyramidal and multipolar neurons were found inside the transplant. Glial cells were found in many parts of the transplanted tissue, without any regular pattern. At 60 days, the transplanted tissue showed a further advance in the development of neurons and glial cells (Fig. 3C). Neurons in the graft presented multipolar, piriform, and triangular-shaped somas that appeared quite similar to the host cortex but not in the same stage of development. The cells in the transplanted tissue were surrounded by abundant vascularization and well-developed glial cells (Fig. 3C, g). These glial cells were identified as astrocytes (Fig. 3C, ga) and oligodendrocytes (Fig. 3C, go). Ramifications of the axons can be observed in the cell's own dendritic field (Fig. 3C, neuron 5) or in a straight direction (Fig. 3C, neurons 2 and 6). Fibers were more abundant in the border of the transplant.

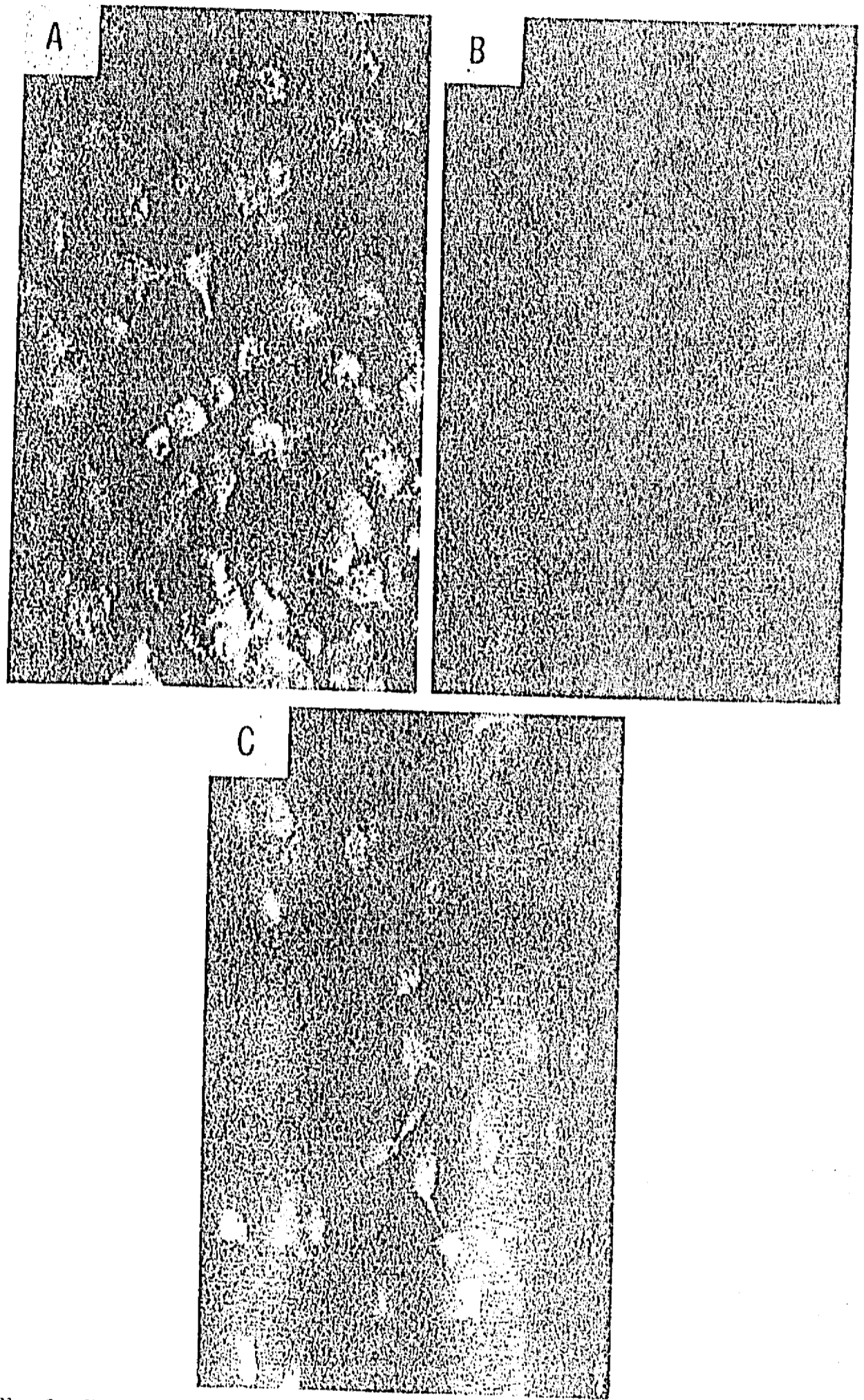


FIG. 2. Representative coronal sections in dark-field illumination of a control subject (A). (B and C) HRP-labeled neurons within homotopic grafts 30 and 60 days after transplant, respectively. A, B, and C  $\times 100$ .

TABLE 1  
Quantitative Analysis of the Presence of the HRP-Labeled Neurons inside the  
Cortical Grafts

Injection site	Days post-transplant			
	15	30	45	60
Thalamus				
Mean	0	13.5	37.5	38.5
SE	—	1.5	7.5	3.5
<i>n</i>	2	2	2	2
Amygdala				
Mean	0	9.5	33.5	31
SE	—	0.5	1.5	2.0
<i>n</i>	2	2	2	2

Note. See Fig. 2.

#### Acetylcholinesterase Reactivity

The 15-day animals showed some labeled cells and there were few processes in the transplant. In the 30-, 45-, and 60-day groups there was an increased number of AChE fibers inside the transplants (Fig. 4). These fibers formed patches along the grafts. The 15-day post-transplant groups did not show these AChE patches, since there were few AChE-stained fibers (Fig. 4A). We could not observe any difference in the number of cells among the different transplant groups, although there was an increased AChE reactivity with the G30, G45, and G60 (Fig. 4).

#### DISCUSSION

The behavioral data obtained in these experiments showed that it took the grafts at least 30 days to start producing functional recovery in the host animals. During the initial 15 days post-transplant, the subjects did not show any recuperation in the CTA paradigm (Fig. 1). The animals were able to learn the aversive response to the noxious stimulus after 30 and 45 days post-transplant. At 60 days postgraft the behavioral recovery was almost complete (G60; see Fig. 1), as the grafted group did not show any significant differences with its own control (Fig. 1). The time-dependent behavioral recovery was accompanied by time-dependent histological changes. At 15 days postgraft the cortical transplants did not establish any demonstrable connections with the thalamus or with the amygdala (Table 1). In the 30-, 45-, and 60-day postgraft groups, the brains showed increased connections with both the thalamus, (VPM-VM nuclei) and the amygdala (see Table 1). We could not find a correlation between the number of cells labeled in the transplants and the behavioral

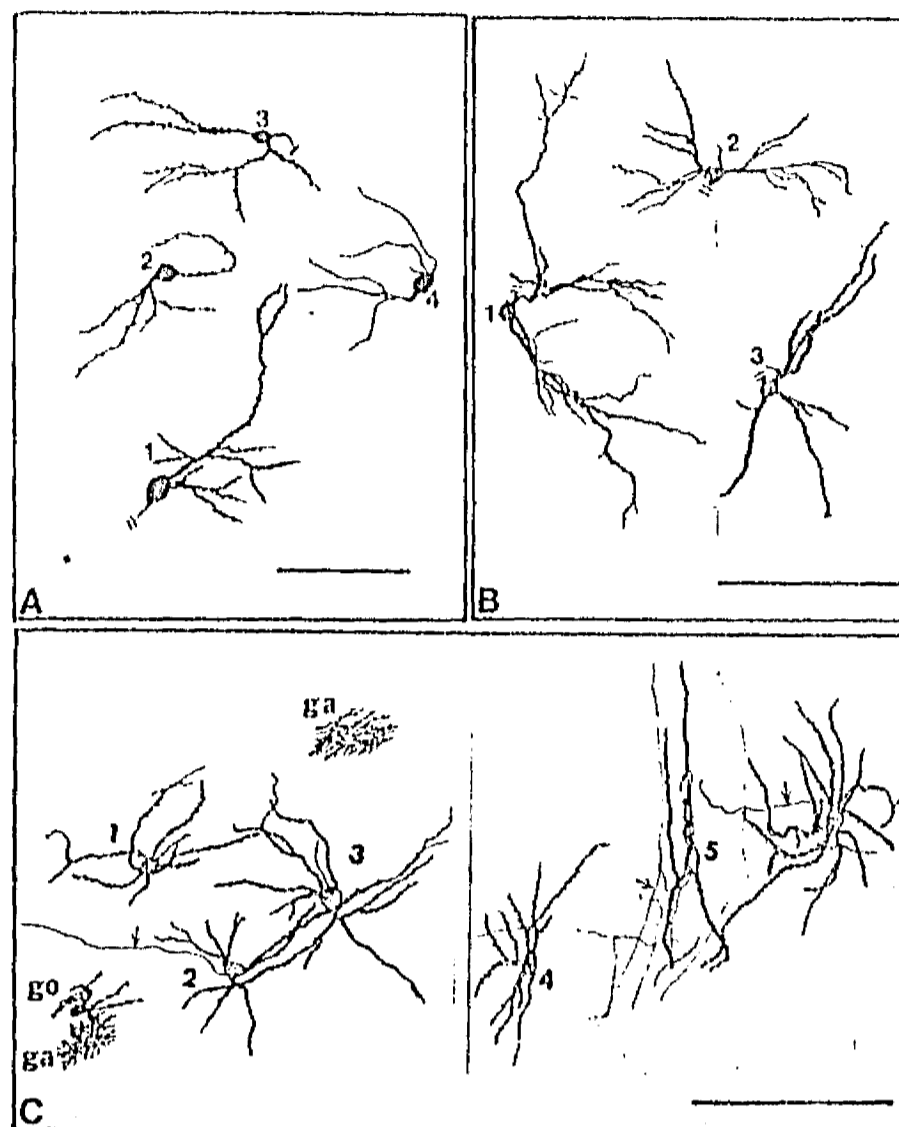


FIG. 3. Camera lucida drawings of Golgi-rapid impregnated neurons from 15-, 30-, and 60-day-old transplants. (A) Drawing of Golgi rapid-impregnated neurons from 15-day-old transplant. Some neurons show a round-shaped soma and dendrites supporting sparse spines (see, cells 2, 3). Cell 1 shows more spines and cell 4 is a nonspiny neuron. (B) Drawing from Golgi-impregnated neurons from 30-day-old transplant. Neuron 1 shows a multipolar shape with spines on its dendrites. (C) Golgi rapid-impregnated neurons from 60-day-old transplant. Neurons 1, 2, 3 show multipolar shape, their dendrites are covered with spines, and they keep close relation with glial cells (g), astrocytes (ga), and oligodendrocytes (go). Neurons 4 and 5 (from the border of the transplant) have large and ramified axons (arrows), and neuron 2 is a typical multipolar cell. Bars represent 100  $\mu$ m at 400X magnifications.

recovery. However, in the case of the group (15 day) that did not show behavioral recovery, there were also no labeled cells in the transplants (see Fig. 1; Table 1).

The neurons of the transplants from the 30- and 60-day postgraft groups showed a more mature cell morphology. In these groups, the Golgi stain revealed that cell bodies were more mature, since they had more dendritic processes with more spines. Nevertheless, the stages of maturation were different from that of the neighborhood host cortical tissue. These results are in agreement with those that have used similar (60-day postgraft)



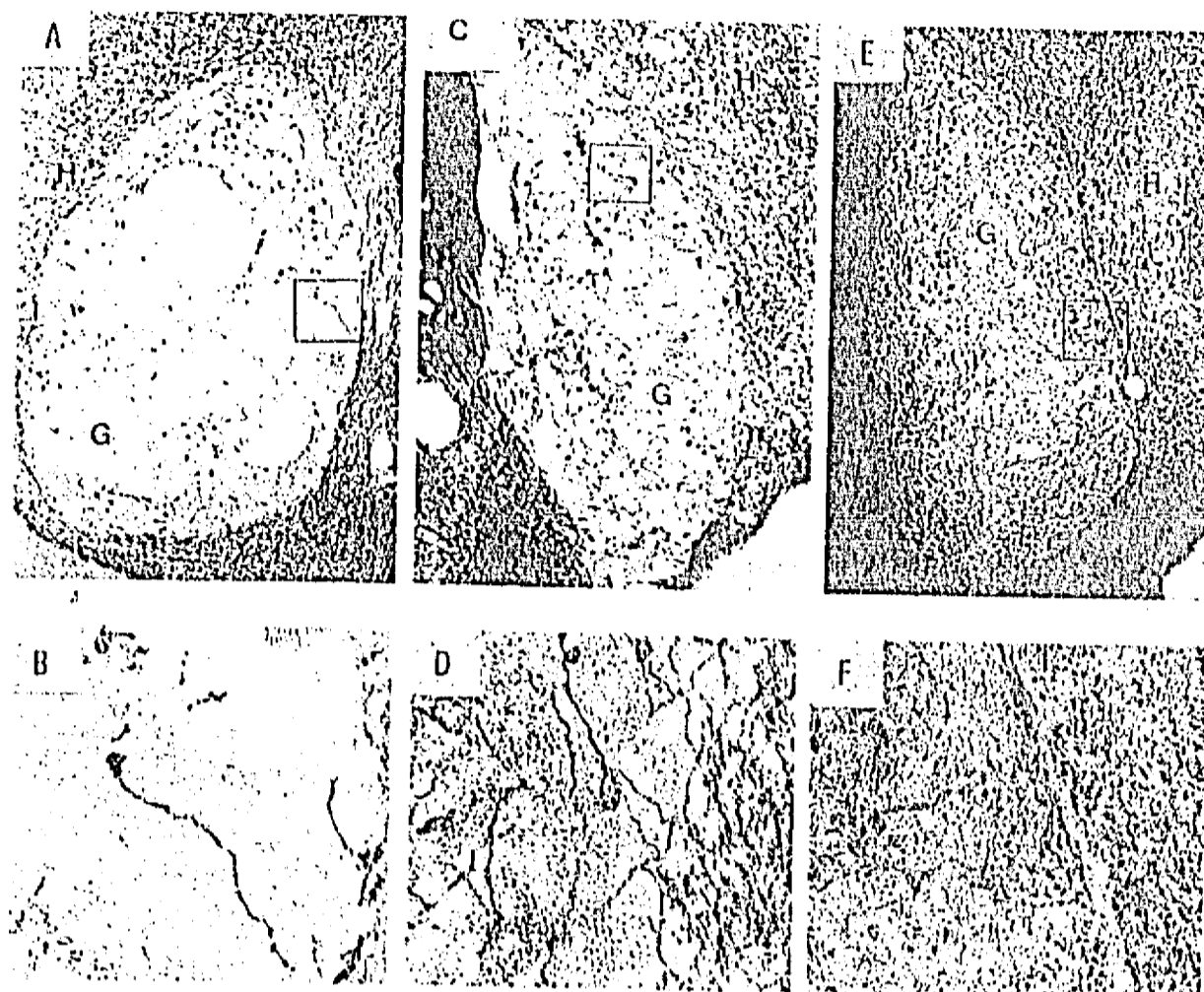


FIG. 4. Acetylcholinesterase reactivity of homotopic neocortical grafts, in 15 (A and B), 30 (C and D), and 60 (E and F) days postgraft. A, C, and E  $\times 320$ . B, D and F  $\times 160$ .

cortical fetal brain transplants (Yirmiya et al., 1988). In contrast, the 15-day post-transplant group showed an immature cell morphology with a small number of dendritic spines observed with the Golgi staining technique, compared to the adjacent host gustatory cortex (see Figs. 3A, 3B, 3C; Jaeger & Lund, 1981).

Our results suggest that some maturation of the transplanted tissue accompanies behavioral recovery. The maturity of the neurons can be determined by the number of their connections, which include, in part, those established between the transplant and the host. Recently, some authors have reported the establishment of connections between cortical grafts and the thalamus in neonatal rats 2 to 4 months after transplantation (Castro, Zimmer, Sunde, & Bold, 1985). Other studies have also shown that the thalamus of the adult brain could establish only a few connections with the cortical transplants, from 8 to 28 weeks after transplantation (Gonzalez, Sharp, & Loken, 1988). We had previously demonstrated that 60-day transplants of the gustatory neocortex could establish connections with the VPM-VM and the amygdala, although the number of labeled cells was not as great as in control animals (Table 1; Escobar et al., 1989). In the present paper, the results suggest that the transplanted neurons



required more than 15 days to start making connections with both the thalamus (VPM and VM) and the amygdala. In addition, with the use of the Golgi impregnation, in the 60-day grafts we were able to see some fibers crossing the boundaries of the transplant into the host tissue, indicating a dynamic process of interaction between the transplant and the host tissue. However, there was not a laminar arrangement in the grafts as in the normal host tissue, indicating that grafted neuronal tissue follows its own developmental and maturation neuronal patterns. These results are in agreement with those of others, who found partial functional recovery without a normal laminar arrangement of fetal cortical brain transplant. (Mufson, Labbe, & Stein, 1987; Yirmiya et al., 1988). However, fetal cortical transplants in the central hemisphere of newborn rats showed laminar patterns in a supra- and infragranular laminae, which resembled the normal cortical laminar distribution (Castro et al., 1987), since the factor for the lamination neocortical pattern appears in postnatal development.

One of the explanations for behavioral recovery, from the results presented here, is that some morphological recuperation is needed, since it is necessary to wait at least 30 days to start seeing any functional recovery in gustatory neocortex-lesioned rats. However, it has been suggested by other authors that structural and morphological integrity of fetal brain grafts may not be essential for behavioral recovery after brain injury (Dunnett, Ryan, Levin, Reynolds, & Bunch, 1987; Kesslak et al., 1986; Stein, Palatucci, Kahan, & Labbe, 1988). These authors have speculated that brain injury and/or brain grafts induced a release of neurotrophic substances that can reactivate neural function and/or prevent injury-induced degeneration in the damaged host brain (Dunnett, et al., 1987; Kesslak et al., 1986). In our results the possibility is low that neurotrophic factors alone may be involved in the functional recovery since it was necessary to wait at least 30 days to see any recuperation. The best recovery was reached at 60 days postgraft (see Fig. 1). This observation is supported by the finding that homotopic cortical but not heterotopic occipital, cortical, or tectal fetal brain transplants could restore the associations between taste cues and illness (Escobar et al., 1989; Lopez-Garcia, Fernandez-Ruiz, Bermudez-Rattoni, & Tapia, 1990). Therefore, if neurotrophic factors are involved they need to be associated with cortical homotopic and/or with some time-dependent factor to start producing functional recovery.

The demonstration of the AChE expression in the transplant in our results is congruent with previous observations (Hohmann & Ebner, 1988). Thus, other authors (Park, Clinton, & Ebner, 1984) found AChE expression after 7 days of cortical transplantation. However, it was only after 2 months that they found AChE reactivity similar to that of the cortical host tissue (Park et al., 1984). In this paper, we are showing the time

course of AChE graft expression. There was observed a great reactivity for AChE in the somas but few processes for the 15-day postgraft group. The number of all processes increased AChE reaction at 30, 45, and 60 days postgraft. Moreover, in a recent paper it was shown that acetylcholine can be released from homotopical but not from occipital cortical grafts and that this was correlated with recovery of CTA with 60-day fetal neocortical grafts (Lopez-Garcia et al., 1990).

Recently, several authors have demonstrated the presence of trophic factors delivered by specific systems. For example, Zhou and co-workers (Zhou, Averbach, & Azmitia, 1987) described the enhanced proliferation of processes from raphe-transplanted but not locus coeruleus-transplanted neurons when they were placed in serotonin-denervated hippocampus. Moreover, when a hippocampal transplant is placed near undamaged host hippocampus, the raphe neurons of the host are capable of innervating the new target sites, indicating that there is some kind of chemotaxis (Zhou, Averbach, & Azmitia, 1988). So, it seems that some trophic factors could guide the neuronal processes with some specificity and finally could lead to the formation of new connections.

In the case of the establishment of connections between GN and VPM, it may be possible that these connections are mediated by trophic factors (Zhou et al., 1987, 1988). In our model, there are at least two potential sources of factors: the transplant itself and the lesion-denervated host tissue (Cunningham, Haun, & Chantler, 1987). The interaction of these factors could promote the connection of the transplant with the VPM-VM and amygdala. One possible hypothesis to explain our behavioral results is based on the reactivity between VPM-VM and GN, as proposed by Sharp and Gonzalez (1986). These authors suggested that the reconnections between thalamus and cortex could stop the degenerative processes due to the lesion. In this manner the graft could help the restoration of the lost function.

In conclusion, we have demonstrated that after 30 days postgraft the animals with transplants were able to learn the aversive response in the CTA paradigm. The neurons in the transplant can express AChE in a time-dependent fashion. After 30 days the grafted neurons started to establish connections with the thalamus and amygdala of the host. Finally, the neurons in the older transplants showed a more mature morphology than those in the younger ones. All of these results suggest that cell maturation and reactivity are important for recuperation of the capacity for taste aversion learning in GN-lesioned rats.

#### REFERENCES

- Bermudez-Rattoni, F., Fernandez, J., Sanchez, M., Aguilar-Roblero, R., & Drucker-Colin, R. (1987). Fetal brain transplants induce recuperation of taste aversion learning. *Brain Research*, 416, 147-150.

- Castro, A. J., Tonder, N., Sunde, N. A., & Zimmer, J. (1987). Fetal cortical in the cerebral hemisphere of newborn rats: A retrograde fluorescent analysis of afferents. *Experimental Brain Research*, *66*, 533-542.
- Castro, A. J., Tonder, N., Sunde, N. A., & Zimmer, J. (1988). Fetal neocortical grafted to the cerebral cortex of newborn rats receive afferents from the basal locus coeruleus and midline raphe. *Experimental Brain Research*, *69*, 613-620.
- Castro, A. J., Zimmer, J., Sunde, N. A., & Bold, E. L. (1985). Transplantation of fetal cortex to the brain of newborn rats: A retrograde fluorescent analysis of cerebral thalamic projections from transplant to host. *Neuroscience Letters*, *60*, 283-286.
- Collier, T. J., Gash, D. M., & Sladek, J. R. (1988). Transplantation of NE neurons aged improves performance of a learned task. *Brain Research*, *448*, 77-87.
- Cunningham, T. J., Haun, F., & Chantler, P. D. (1987). Diffusible proteins prolong survival of dorsal lateral geniculate neurons following occipital cortex lesions in newborn rats. *Developmental Brain Research*, *37*, 133-141.
- Dunnett, S. B., Low, W. C., Iversen, J. D., Stenevi, U., & Bjorklund, A. (1982). Transplants restore maze learning in rats with fornix-fimbria lesions. *Brain Research*, *257*, 330-348.
- Dunnett, S. B., Ryan, C. N., Levin, P. D., Reynolds, M., & Bunch, S. T. (1987). Functional consequences of embryonic neocortex transplanted to rats with prefrontal cortex lesions. *Behavioral Neuroscience*, *101*, 489-503.
- Ebner, F. F. (1988). The development of functional connections between transplanted embryonic and mature cortical neurons. In D. M. Gash & J. R. Sladek, Jr. (Eds.), *Progress in brain research* (Vol. 78, pp. 3-11). Amsterdam: Elsevier.
- Escobar, M., Fernandez, J., Guevara-Aguilar, R., & Bermudez-Rattoni, F. (1989). Brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with unilateral neocortex lesion. *Brain Research*, *478*, 368-374.
- Fine, A., Dunnett, S. B., Bjorklund, A., & Iversen, S. D. (1985). Cholinergic forebrain grafts into the neocortex improve passive avoidance memory in a rat model of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Science*, *82*, 5227-5231.
- Floeter, M. K., & Jones, E. G. (1985). Transplantation of fetal-postmitotic neurons into the cerebral cortex: Survival, early pathway choices and long-term projection of outgrowing axons. *Developmental Brain Research*, *22*, 19-38.
- Garcia, J., Lasiter, P. J., Bermudez-Rattoni, F., & Deems, D. (1985). A generalization of the Garcia effect of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Science*, *443*, 8-20.
- Gonzalez, M. F., Sharp, F. R., & Loken, J. E. (1988). Fetal frontal cortex transplanted to injured motor/sensory cortex of adult rats: Reciprocal connections with host thalamus demonstrated with WGA-HRP. *Experimental Neurology*, *99*, 154-165.
- Hohmann, C. F., & Ebner, F. F. (1988). Basal forebrain lesions facilitate adult host cell ingrowth into neocortical transplants. *Brain Research*, *448*, 55-66.
- Huang, H. H., Kissane, J. Q., & Hawrylewicz, E. J. (1987). Restoration of sexual function and fertility by fetal hypothalamic transplants in impotent aged male rats. *Neurobiology of Aging*, *8*, 465-472.
- Isacson, O., Dunnett, S. B., & Bjorklund, A. (1986). Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, *83*, 2728-2732.
- Jaeger, C. B., & Lund, R. D. (1981). Transplantation of embryonic occipital cortex to the brain of newborn rats: A Golgi study of mature and developing transplants. *Journal of Comparative Neurology*, *200*, 213-230.
- Kesslak, J. P., Nieto-Sampedro, M., Globus, J., & Cotman, C. W. (1986). Transplants of purified astrocytes promote behavioral recovery after frontal cortex ablation. *Experimental Neurology*, *92*, 377-390.
- Kesslak, J. P., Walencewicz, A., Calin, L., Nieto-Sampedro, M., & Cotman, C. W. (1988).

- Castro, A. J., Tonder, N., Sunde, N. A., & Zimmer, J. (1987). Fetal cortical transplants in the cerebral hemisphere of newborn rats: A retrograde fluorescent analysis of connections. *Experimental Brain Research*, *66*, 533-542.
- Castro, A. J., Tonder, N., Sunde, N. A., & Zimmer, J. (1988). Fetal neocortical transplants grafted to the cerebral cortex of newborn rats receive afferents from the basal forebrain, locus coeruleus and midline raphe. *Experimental Brain Research*, *69*, 613-622.
- Castro, A. J., Zimmer, J., Sunde, N. A., & Bold, E. L. (1985). Transplantation of fetal cortex to the brain of newborn rats: A retrograde fluorescent analysis of callosal and thalamic projections from transplant to host. *Neuroscience Letters*, *60*, 283-288.
- Collier, T. J., Gash, D. M., & Sladek, J. R. (1988). Transplantation of NE neurons into aged improves performance of a learned task. *Brain Research*, *448*, 77-87.
- Cunningham, T. J., Haun, F., & Chantler, P. D. (1987). Diffusible proteins prolong survival of dorsal lateral geniculate neurons following occipital cortex lesions in newborn rats. *Developmental Brain Research*, *37*, 133-141.
- Dunnett, S. B., Low, W. C., Iversen, J. D., Stenevi, U., & Bjorklund, A. (1982). Septal transplants restore maze learning in rats with fornix-fimbria lesions. *Brain Research*, *257*, 330-348.
- Dunnett, S. B., Ryan, C. N., Levin, P. D., Reynolds, M., & Bunch, S. T. (1987). Functional consequences of embryonic neocortex transplanted to rats with prefrontal cortex lesions. *Behavioral Neuroscience*, *101*, 489-503.
- Ebner, F. F. (1988). The development of functional connections between transplanted embryonic and mature cortical neurons. In D. M. Gash & J. R. Sladek, Jr. (Eds.), *Progress in brain research* (Vol. 78, pp. 3-11). Amsterdam: Elsevier.
- Escobar, M., Fernandez, J., Guevara-Aguilar, R., & Bermudez-Rattoni, F. (1989). Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion. *Brain Research*, *478*, 368-374.
- Fine, A., Dunnett, S. B., Bjorklund, A., & Iversen, S. D. (1985). Cholinergic ventral forebrain grafts into the neocortex improve passive avoidance memory in a rat model of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Science*, *82*, 5227-5230.
- Floeter, M. K., & Jones, E. G. (1985). Transplantation of fetal-postmitotic neurons to rat cortex: Survival, early pathway choices and long-term projection of outgrowing axons. *Developmental Brain Research*, *22*, 19-38.
- Garcia, J., Lasiter, P. J., Bermudez-Rattoni, F., & Deems, D. (1985). A general theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Science*, *443*, 8-20.
- Gonzalez, M. F., Sharp, F. R., & Loken, J. E. (1988). Fetal frontal cortex transplanted to injured motor/sensory cortex of adult rats: Reciprocal connections with host thalamus demonstrated with WGA-HRP. *Experimental Neurology*, *99*, 154-165.
- Hohmann, C. F., & Ebner, F. F. (1988). Basal forebrain lesions facilitate adult host fiber ingrowth into neocortical transplants. *Brain Research*, *448*, 55-66.
- Huang, H. H., Kissane, J. Q., & Hawrylewicz, E. J. (1987). Restoration of sexual function and fertility by fetal hypothalamic transplants in impotent aged male rats. *Neurobiology of Aging*, *8*, 465-472.
- Isacson, O., Dunnett, S. B., & Bjorklund, A. (1986). Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington disease. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, *53*, 2728-2732.
- Jaeger, C. B., & Lund, R. D. (1981). Transplantation of embryonic occipital cortex to the brain of newborn rats: A Golgi study of mature and developing transplants. *Journal of Comparative Neurology*, *200*, 213-230.
- Kesslak, J. P., Nieto-Sampedro, M., Globus, J., & Cotman, C. W. (1986). Transplants of purified astrocytes promote behavioral recovery after frontal cortex ablation. *Experimental Neurology*, *92*, 377-390.
- Kesslak, J. P., Walenciewicz, A., Calin, L., Nieto-Sampedro, M., & Cotman, C. W. (1988).

- Hippocampal but not astrocyte transplants enhance recovery on a forced choice alternation task after kainate lesions. *Brain Research*, 454, 347-354.
- Kiefer, S. W. (1985). Neural mediation of conditioned food aversion. *Annals of the New York Academy of Science USA*, 443, 100-109.
- Labbe, R., Firl, A., Mufson, E. J., & Stein, D. G. (1983). Fetal brain transplants reduction of cognitive deficit in rats with frontal cortex lesions. *Science*, 221, 470-472.
- Lasiter, P. J., & Glanzman, D. L. (1985). Cortical substrates of taste aversion learning: Involvement of the dorsolateral amygdaloid nuclei and temporal neocortex in taste aversion learning. *Behavioral Neuroscience*, 99, 257-276.
- Lopez-Garcia, J. C., Fernandez-Ruiz, J., Bermudez-Rattoni, F., & Tapia R. (1990). Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts. *Brain Research*, 523, 105-110.
- Mesulam, M. M. (1982). *Tracing neural connections with horseradish peroxidase*. New York: Wiley.
- Mufson, E. J., Labbe, R., & Stein, D. G. (1987). Morphologic features of embryonic neocortex grafts in adult rats following frontal cortical ablation. *Brain Research*, 401, 162-167.
- Nachman, M. (1963). Learned aversion to the taste of lithium chloride and generalization to other salts. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 56, 343-349.
- Park, J., Clinton, R. J., & Ebner, F. F. (1984). The growth of catecholamine- and AChE-containing fibers into neocortical transplants. *Society for Neuroscience Abstracts*, 10, 1083.
- Paxinos, G., & Watson, Ch. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academy Press.
- Robertson, R. T. (1987). A morphogenic role for transiently expressed acetylcholinesterase in developing thalamocortical systems? *Neuroscience Letters*, 75, 259-264.
- Sharp, F. R., & Gonzalez, M. F. (1986). Fetal cortical transplants ameliorate thalamic atrophy ipsilateral to neonatal frontal cortex lesions. *Neuroscience Letters*, 71, 247-251.
- Stein, D. G., Palatucci, Ch., Kahan, D., and Labbe, R. (1988). Temporal factors influence recovery of function after embryonic brain tissue transplants in adult rats with frontal cortex lesions. *Behavioral Neurosciences*, 102, 260-267.
- Woodruff, M. L., Braidsen, R. H., Whittington, D. L., & Benson, A. E. (1987). Embryonic hippocampal grafts ameliorate the deficit in DRL acquisition produced by hippocampectomy. *Brain Research*, 408, 97-117.
- Yirmiya, R., Zhou, F. C., Holder, M. D., Deems, D. A., & Garcia, J. (1988). Partial recovery of gustatory function after neural tissue transplantation to the lesioned gustatory neocortex. *Brain Research Bulletin*, 20, 619-625.
- Zhou, F. C., Averbach, J. B., & Azmitia, E. C. (1987). Denervation of serotonergic fibers in the hippocampus induced trophic factor which enhances the maturation of transplanted serotonergic neurons but not norepinephrine nervous. *Journal of Neuroscience Research*, 17, 235-246.
- Zhou, F. C., Averbach, J. B., & Azmitia, E. C. (1988). Transplanted raphe and hippocampal fetal neurons do not displace afferent inputs to the dorsal hippocampus from serotonergic neurons in the median raphe nucleus of the rat. *Brain Research*, 450, 51-59.

**TRABAJO VI**

## EFFECTS OF NERVE GROWTH FACTOR ON THE RECOVERY OF CONDITIONED TASTE

### AVERSION IN THE INSULAR CORTEX LESIONED RATS

Federico Bermúdez-Rattoni, Martha L. Escobar, Ana Luisa Piña,  
Ricardo Tapia, Juan Carlos López-García and Marcia Hiriart

Instituto de Fisiología Celular  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apdo. Postal 70-600  
México, D.F.

#### INTRODUCTION

Recent research in our laboratory has focused on the influence of brain grafts on the recovery of learning ability in cortical-lesioned animals. The findings suggest that graft maturation and/or cholinergic activity may play a role in the graft-mediated behavioral recovery following brain lesions.

#### THE BEHAVIORAL MODEL: CONDITIONED TASTE AVERSION

Our studies have used conditioned taste aversion paradigms (CTA) to examine the effects of brain grafts on learning in cortically lesioned rats. Animals can acquire aversions to flavors if the taste stimulus (CS) is followed by gastrointestinal illness (Garcia et al., 1985) as an unconditioned stimulus (US). Taste is readily associated with illness and can be observed after a single taste-illness experience. Flavor-illness association has been demonstrated in several laboratories and in different animal species. A major advantage of this model in the study of the neurobiology of learning and memory is the knowledge of the neural pathways involved. The pathways for CTA have been established with the use of anatomical, electrophysiological and behavioral methods (for review see Garcia et al., 1985; Kiefer, 1985).

#### THE INSULAR CORTEX

The insular cortex (IC) has been referred to as gustatory or visceral cortex, since it receives taste and visceral information from the ventromedial nucleus of the thalamus that, in turn, receives afferences from the pontine parabrachial nucleus, which is a second-order relay for taste and visceral information (for review see Norgren, 1989; Kiefer, 1985). The anatomical connections of the IC clearly suggest that this brain region may play a role in integrating and possibly storing visceral information (see Garcia et al., 1985). Moreover, it has been postulated that the IC receives convergence of limbic afferences and primary sensory inputs that is not seen within any other sensory area in the cortex (Krushel and van der Kooy, 1988). Among the IC connections that may be important for memory processing are those with the limbic system; i.e., amygdala, dorso-medial nucleus of the thalamus and prefrontal cortex (Krushel and van der

Kooy, 1988; Bermúdez-Rattoni and McGaugh, 1991; Escobar et al., 1989; van der Koy, 1984).

Although the IC connectivity is fairly well known, the neurotransmitters of the IC have not been extensively studied. In this regard, we have recently demonstrated that slices taken from the IC are able to release labeled GABA, ACh and glutamate but not dopamine. Additionally, there are significant glutamic acid decarboxylase, choline acetyl transferase and acetylcholinesterase activities in IC homogenates (Lopez-Garcia et al., 1990a).

Several studies have shown that the insular cortex area is involved in mediating the associative aspects of taste response, but is not involved in the hedonic responses to taste. Rats lacking the IC are impaired in acquiring and retaining taste aversion. That is, when the IC lesions are made either before or after acquisition of the CTA animals do not show taste aversion. However, the hedonic responses of lesioned IC rats appear to be normal: like normal rats, IC-lesioned animals prefer sucrose as well as low concentrations of sodium chloride over water and reject quinine and acid solutions. Also, it is known that taste responsiveness remains intact even in decerebrate rats (Kiefer, 1985; Braun, et al., 1982; Grill & Norgren, 1978).

#### RECOVERY OF FUNCTIONS BY FETAL BRAIN GRAFTS

Functional behavioral recovery from brain injury has recently been demonstrated using the fetal brain transplant technique in adult mammalian brains. It has been established that transplanted neurons differentiate and make connections with the host brain (Bjorklund and Stenevi, 1985). We recently showed that the fetal brain transplants produced a significant recovery in the ability of IC-lesioned rats to acquire a CTA. The possibility of spontaneous recovery was excluded, because the animals with IC lesions that did not receive transplants were unable to acquire the CTA 8 weeks after the transplantation, even with two series of acquisition trials (Bermúdez-Rattoni et al., 1987). In contrast, animals with lesions in the amygdala showed spontaneous recovery eight weeks after the lesion was induced. Similar spontaneous recovery of performance in an alternation task has been found in animals tested 6 weeks after having received large cortical ablations (Dunnett et al., 1987).

Elsewhere we have discussed in detail these functional differences between the amygdala and IC (Bermúdez-Rattoni et al., 1987). One possible explanation is that amygdala lesions may have resulted in reorganization of other elements in the neuronal network. Another plausible explanation is that for taste-aversion learning the IC may be a permanent memory store, whereas the amygdala may only serve to influence an initial step in the storage of CTA (Bermúdez-Rattoni et al., 1987; Bermúdez-Rattoni et al., 1989).

We have further shown that the degree of functional recovery induced by fetal brain tissue grafts depends on the place from which graft tissue was taken. Animals which received homotopic but not occipital cortical tissue recovered the CTA. Further, the animals that received either tectal heterotopic tissue or no transplant showed no behavioral recovery. Results based on horseradish peroxidase (HRP) histochemistry revealed that cortical, but not brain-stem grafts, established connections with amygdala and with the ventromedial nucleus of the thalamus (Escobar et al., 1989). Biochemical analyses revealed that IC fetal grafts released GABA, ACh and glutamate in response to K<sup>+</sup> depolarization. In contrast, occipital grafts



1991; Escobar et al., 1989; van

ly well known, the neurotransmitter studied. In this regard, we have from the IC are able to release dopamine. Additionally, there are choline acetyl transferase and histogenates (Lopez-Garcia et al.,

the frontal cortex area is involved in the response, but is not involved in making the IC are impaired in habits, when the IC lesions are made. The CTA animals do not show responses of lesioned IC rats appear and animals prefer sucrose as well as water and reject quinine and taste responsiveness remains intact (Lund, et al., 1982; Grill &

5

brain injury has recently been an technique in adult mammalian implanted neurons differentiate (Bjorklund and Stenevi, 1985). We plants produced a significant response to acquire a CTA. The possibility is to use the animals with IC are unable to acquire the CTA 8 two series of acquisition contrast, animals with lesions 7-8 weeks after the lesion of performance in an alternation of tasks after having received large

these functional differences (Lund et al., 1987). One possible explanation is that they have resulted in reorganization. Another plausible explanation may be a permanent memory to influence an initial step in (Lund, 1987; Bermúdez-Rattoni et

of functional recovery induced by the place from which graft tissue is placed. In occipital cortical animals that received either tectal or occipital grafts, there was no behavioral recovery. Histochemistry revealed that tectal connections with amygdala and hippocampus (Escobar et al., 1989). Hippocampal grafts released GABA, ACh and dopamine. In contrast, occipital grafts

released labeled GABA and glutamate, but not ACh (Lopez-Garcia et al., 1990b). These results suggest that cholinergic transmission is important for CTA and that ACh may play a role in graft-mediated behavioral recovery.

The results discussed above indicate that some morphological recovery is necessary for the acquisition of taste aversion. However, it has been suggested that structural and morphological integrity of fetal brain grafts may not be essential for behavioral recovery after cortical brain injury (Dunnett et al., 1987; Kesslak et al., 1986). These investigators have speculated that brain injury or brain grafts induce a release of neurotrophic factors that can reactivate neural function and/or prevent injury-induced degeneration in the damaged host brain (Dunnett et al., 1987; Kesslak et al., 1986). Labbe and coworkers (1983) reported that rats lesioned in the frontal cortex and given cortical transplants were able to learn a spatial alternation task in fewer trials than lesioned controls or rats with cerebellar implants. The recovery effects were seen just one week after transplantation. In this regard, Dunnett and coworkers (1987) found that neocortical grafts produced short-lasting improvement in the T-maze alternation performance. They concluded that the short-lasting effects were attributable to diffused influences of the embryonic tissue on the lesioned host brain instead of a reconnection of the damage circuits. In contrast, findings from our laboratory clearly suggest that, with CTA, recovery of function increases with time after transplant.

#### TIME-DEPENDENT RECOVERY

In a series of experiments in our laboratory, rats with lesions of IC showing disrupted taste aversion received neocortical transplants and were retrained at 15, 30, 45 and 60 days after transplantation. The behavioral results showed almost complete functional recovery at 60 days, slight recovery at 45 and 30 days and a poor recovery at 15 days post-graft. HRP histochemistry revealed that at 15 days there were no HRP labeled cells in the ventromedial nucleus or into the amygdala. At 30, 45 and 60 days post-graft, there were increasing connections, almost as many as those seen in the controls, with the thalamus and with the amygdala. The behavioral recovery was correlated with increased acetylcholinesterase activity, detected histochemically, and with morphological maturation, revealed by Golgi staining (Fernández-Ruiz et al., 1991). The possibility that neurotrophic factors alone may be involved in the functional recovery is unlikely, because it is necessary to wait at least 30 days to see any recuperation. Therefore, such findings suggest that if neurotrophic factors are involved, they need to be associated with cortical homotopic grafts and/or with some time dependent factor essential for producing functional recovery. The implication of these series of experiments is that, for the IC and CTA, functional recovery is related to the morphological maturation of the graft.

#### THE ROLE OF THE NERVE GROWTH FACTOR IN FUNCTIONAL RECOVERY

Several lines of evidence have demonstrated that the nerve growth factor (NGF) produces a significant regeneration, regrowth and penetration of cholinergic axons in the hippocampal formation (Gage 1990; Hagg et al., 1990). Chronic perfusion of NGF, in fimbria-fornix lesioned animals with severe learning impairments, produce functional and anatomical recovery (Varon et al., 1989). It has also been demonstrated that chronic intracerebral infusion of NGF improves memory performance in cognitively impaired aged rats (Gage and Bjorklund, 1986). Nevertheless, long-term impairments by application of NGF in combination with intrahippocampal septal grafts have been observed (Pallage et al., 1986).

In another series of experiments, we have assessed the role of NGF on the recovery of acquired conditioned taste aversions in cortical lesioned rats. For CTA, the animals were habituated for 10 days to drink tap water daily during 5 min sessions. After surgery, the animals were given one acquisition trial and two testing trials conducted every fourth day with baseline access to distilled water on the intervening days. The acquisition day involved the presentation of 0.1 M LiCl instead of water. It has been demonstrated that the taste of LiCl can readily be aversively conditioned to its gastric aftereffects, since it is also the agent inducing illness (Nachmann, 1963). The tests consisted of the presentation of 0.1 M of NaCl instead of the LiCl with three water intake baseline measures in between (see Bermúdez-Rattoni et al., 1987; Fernández-Ruiz et al., 1991). Rats cannot discriminate between the flavors of NaCl and LiCl (Nachmann, 1963). Three groups of rats showing disrupted taste aversions due to IC electrolytic lesions were grafted as follows: the first group received fetal (15E) cortical graft + NGF (ICNGF), the second group received gelfoam + NGF (NGF), and the third group received fetal cortical graft alone (IC). Unoperated animals were used as a control group (CON). The three grafted and control groups were subdivided in three subgroups (ICN, ICNGF, NGF and CON) that were retrained for CTA at 15-, 30- and 60-days post-graft respectively. As expected, the control groups showed strong taste aversions in all the post-graft times (see Fig. 1). The IC group showed a disrupted taste aversion at 15 days post-graft. During the 30 and 60 post-transplantation day, the IC groups showed recovered taste aversion when compared with the CON group. The ICNGF group showed a significantly recovered ability to acquire the taste aversions at the three post-graft times when compared with the NGF alone group. These results indicate that the application of NGF with the cortical graft accelerate the functional recovery up to 15 days after grafting.

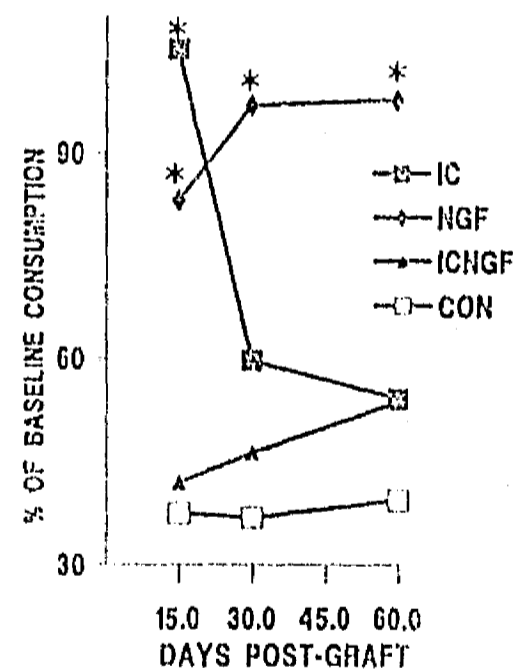


Fig. 1. The amount of NaCl consumed by control (CON), Insular Cortex (IC), Insular Cortex + NGF (ICNGF), and NGF with gelfoam grafted groups at 15-, 30-, and 60-days postgraft. \*  $p < 0.05$  (Newman-Keuls' test). For comparison the group CI was redrawn from Fernández-Ruiz et al., 1991.

have assessed the role of NGF on aversions in cortical lesioned rats for 10 days to drink tap water, the animals were given one conducted every fourth day with intervening days. The acquisition of CI instead of water. It has an readily be aversively condition is also the agent inducing instead of the presentation of 0.1 at intake baseline measures in ; Fernández-Ruiz et al., 1991). rats of NaCl and LiCl (Nachmann, pted taste aversions due to IC ws the first group received th. second group received eceived fetal cortical graft s a control group (CON). The iv. ed in three subgroups (ICN, r (A at 15-, 30- and 60-days control groups showed strong s (see Fig. 1). The IC group ys post-graft. During the 30 ou. showed recovered taste The ICNGF group showed a signif- aste aversions at the three F one group. These results th cortical graft accelerate r grafting.

\*  
 — IC  
 — NGF  
 — ICNGF  
 — CON

60.0  
IAFT

control (CON), Insular Cortex NGF and NGF with gelfoam grafted postgraft. \* p < 0.05 (Newman- one group CI was redrawn from

The possibility that combinations of NGF with any other brain tissue could produce functional recovery in IC lesioned animals is currently being evaluated in our laboratory. Briefly, four groups of IC-lesioned rats showing disrupted taste aversions received either cortical graft + NGF, cortical graft + DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), mesencephalic tissue with NGF, or mesencephalic tissue alone. All the groups were retrained 15 days after transplantation. The results clearly indicate that the combination cortical grafts with NGF produce significant recovery in the lesioned animals to acquire taste aversions. Those animals that received mesencephalic grafted tissue in combination with NGF, mesencephalic tissue alone, or the vehicle with cortical grafts were unable to acquire the taste aversions after 15 days postgraft. The histochemical results show the presence of positive immunoreaction for NGF and many AChE positive labeled fibers and somas into the grafts of the cortical with NGF group. The grafts from the same group showed a noticeable growth and integration with the host tissue. In addition, preliminary biochemical experiments showed that choline-acetyltransferase (ChAT) activity in this group was very similar to that of the unoperated controls.

#### CONCLUSIONS

In our model, the application of NGF alone did not produce significant functional recovery in any of the post-graft times tested. In contrast, other authors using different learning models and different brain regions have found, after few days post-graft, recovery following acute application of NGF or other trophic factors (Kesslak, et al., 1986; Will and Hefti, 1985; Hefti et al., 1984; Hefti, 1986). Varon and coworkers have found functional recovery by chronic administration of NGF in fornix lesioned animals that had evidenced severe impairments in a Morris spatial task (Varon et al., 1989). In our study, the best functional recovery was seen when the NGF was associated with homotopical cortical grafts but not with heterotopical mesencephalic grafts or the application of NGF alone. These behavioral results appear to be related with the integration and maturity of the grafted tissue. Preliminary results using the Golgi staining technique indicate that the cortical grafts with NGF showed more neuronal maturation compared to the other groups. Therefore, as mentioned, if neurotrophic factors are involved, they need to be associated with cortical homotopic grafts and/or certain cortical factors essential for producing functional recovery.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Grant from DGAPA-UNAM IN-204689. We thank Mrs. María Teresa Torres for preparing the manuscript.

#### REFERENCES

- Bermúdez-Rattoni, F., Fernández, J., Sánchez, M.A., Aguilar-Roblero, R. and Drucker-Colín, R., 1987, Fetal brain transplants induce recuperation of taste aversion learning. *Brain Res.*, 416: 147-152.
- Bermúdez-Rattoni, F., Fernández, J. and Escobar, M.L., 1989, Fetal brain transplants induce recovery of morphological and learning deficits of cortical lesioned rats. In: Cell function and disease. L.E. Cañedo, L.E. Todd, L. Packer and J. Jaz (Eds.) Plenum Publishing Corporation.
- Bermúdez-Rattoni, F., and McGaugh, J.L., 1991, Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res.* 549: 165-170.

- Bjorklund, A. and Stenevi, U., 1985, Intracerebral neural implants: Neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries. Ann. Rev. Neurosci. 7: 279-308.
- Braun, J.J., Lasiter, P.S. and Kiefer, S.W., 1982, The gustatory neocortex of the rat. Physiol. Psychol. 10: 13-45.
- Dunnett, S.B., Ryan, C.N., Levin, P.D., Reynolds, M. and Bjorklund, A., 1987, Functional consequences of embryonic neocortex transplanted to rats with prefrontal cortex lesions. Behav. Neurosci. 101: 489-503.
- Escobar, M., Fernández-Ruiz, 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.
- Fernández-Ruiz, J., Escobar, M.L., Piña, A.L., Díaz-Cintra, S., Cintra-McGlone, F.L. and Bermúdez-Rattoni, F., 1991, Time-dependent recovery of taste aversion learning by fetal brain transplants in gustatory neocortex-lesioned rats. Behav. and Neural Biol., 55: 179-193.
- Gage, F.H., 1990, NGF-dependent sprouting and regeneration in the hippocampus, Progress in Brain Res. 83: 357-370.
- Gage, F.H. and Bjorklund, A., 1986, Enhanced graft survival in the hippocampus following selective denervation. Neurosci. 17: 89-98.
- García, J., Lasiter, P.S., Bermúdez-Rattoni, F. and Deems, D.A., 1985, General theory of aversion learning. Ann. N.Y. Acad. Sci. 443: 8-20.
- Grill, H.J. and Norgren, R., 1978, The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats, Brain Res., 143: 263-279.
- Hagg, T., Vahlsing, H.L., Manthorpe, M. and Varon, S., 1990, Nerve growth factor infusion into denervated adult rat hippocampal formation promotes its cholinergic reinnervation. J. of Neurosci. 10(9): 3087-3092.
- Hefti, F., David, A., Hartikka, J., 1984, Chronic intraventricular injections of nerve growth factor elevate hippocampal choline-acetyltransferase activity in adult rats with partial septo-hippocampal lesions. Brain Res. 293: 305-311.
- Hefti, F., 1986, Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after transections. J. Neurosci., 6: 2155-2162.
- Kesslak, J.P., Brown, L., Steichen, C. and Cotman, C.W., 1986, Adult and embryonic frontal cortex transplants after frontal cortex ablation enhance recovery on a reinforced alternation task. Exp. Neurol. 94: 615-656.
- Kiefer, S.W., 1985, Neural mediation of conditioned food aversions. J. Ann. N.Y. Acad. Sci., 443: 100-109.
- Krushel, L.A. and van der Kooy, D., 1988, Visceral cortex: Integration of the mucosal senses with limbic information in the rat agranular insular cortex. The J. of Comp. Neurol. 270: 34-54.
- Labbe, R., Firl, A., Mufson, E. and Stein, D., 1983, Fetal brain transplants reduction of cognitive deficit in rats with frontal cortex lesions. Science 221: 470-472.
- López-García, J.C., Bermúdez-Rattoni, F. and Tapia, R., 1990a, Release of acetylcholine, G-aminobutyrate, dopamine acid glutamate, and activity of some related enzymes, in rat gustatory neocortex. Brain Res., 523: 100-104.
- López-García, J.C., Fernández-Ruiz, J., Bermúdez-Rattoni, F. and Tapia, R., 1990b, Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts. Brain Res., 523: 105-110.
- Nachman, M., 1963, Learned aversion to the taste of lithium chloride and generalization to other salts. J. Comp. Physiol. Psychol. 56: 343-349.

cerebral neural implants:  
tion of damaged circuitries. Ann.

W., 1982, The gustatory neocor-  
D: 13-45.

aynolds, M. and Bjorklund, A.,  
orynic neocortex transplanted to  
I hav. Neurosc. 101: 489-503.  
Aguilar, R. and Bermúdez-Rattoni,  
recovery of learning deficits  
or: neocortex lesion. Brain Res.,

A.L., Díaz-Cintra, S., Cintra-  
F., 1991, Time-dependent  
by fetal brain transplants in  
Bel v. and Neural Biol., 55: 179-

g and regeneration in the hippo-  
35-370.

nce graft survival in the hippo-  
on. Neurosc. 17: 89-98.

ni, F. and Deems, D.A., 1985,  
m. N.Y. Acad. Sci. 443: 8-20.  
as reactivity test. I. Mimetic  
urologically normal rats, Brain

nd Varon, S., 1990, Nerve growth  
t hippocampal formation pro-  
J. of Neurosc. 10(9): 3087-

Chronic intraventricular injec-  
h hippocampal choline-acetyltrans-  
arical septo-hippocampal lesions.

ot survival of septal choliner-  
Neurosci., 6: 2155-2162.

d Cotman, C.W., 1986, Adult and  
after frontal cortex ablation  
eration task. Exp. Neurol. 94:

conditioned food aversions. J.

Visceral cortex: Integration of  
ion in the rat agranular  
Neurosci. 270: 34-54.

, D., 1983, Fetal brain trans-  
t in rats with frontal cortex

and Tapia, R., 1990a, Release of  
amine acid glutamate, and activity  
ary neocortex. Brain Res.,

Bermúdez-Rattoni, F. and Tapia,  
tylcholine release and recovery of  
by fetal neocortex grafts. Brain

he taste of lithium chloride and  
Comp. Physiol. Psychol. 56: 343-

Norgren, R., Nishijo, H. and Travers, S., 1989. Taste Responses from the  
Entire Gustatory Apparatus. In: L.H. Schneider, S.J. Cooper and K.  
A. Halamí (Eds.) The Psychobiology of Human Eating Disorders. Ann.  
N. Y. Acad. Sci., 575: 246-263.

Pallage, V., Toniolo, G., Will, B. and Helti, F., 1986, Long-term effects  
of nerve growth factor and neural transplants on behavior of rats  
with medial septal lesions. Brain Res. 386: 197-208.

van der Kooy, D.L., Koda, L.Y., McGinty, J.F., Gerfen, C.R. and Bloor,  
F.E., 1984, The organization of projections from the cortex to  
amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in  
the rat. J. Comp. Neurol., 224: 1-24.

Varon, S., Hagg, T., Vahlsing, L. and Manthorpe, M., 1989, Nerve growth  
factor in vivo actions on cholinergic neurons in the adult rat CNS.  
In: Cell function and disease. Edited by L.E. Cañedo, L.E. Todd, L.  
Packer and J. Jaz. Plenum Press: 235-248.

Will, B. and Helti, F., 1985, Behavioral and neurochemical effects of  
chronic intraventricular injections of nerve growth factor in adult  
rats with fimbria lesions. Behav. Brain Res. 17: 17-24.

El método de condicionamiento clásico empleado a los sujetos (CAS) que utilizamos en nuestro laboratorio, consistió en una sola sesión, y en el estudio no solo de los procesos cualitativos, en los que se da involucración paulatinamente la corteza inocular, sino que también para el estudio de la neurobiología del aprendizaje y la memoria en el caso de procesos generales conductivos y funcionales del SNC.

La primera etapa de esta sesión (trabajo 1) fue orientada con la finalidad de comprender los procesos temporales que se relacionan a la recuperación funcional y anatómica observadas en los trasplantes cerebrales (Domínguez-Rodríguez, et al., 1987; Escobar, 1988). Llevamos a cabo un análisis conductual y electrofisiológico siguiendo el curso temporal (15, 30, 45, 60) del desarrollo de los trasplantes de CI. Los resultados de estas investigaciones muestran que la recuperación conductual comienza a manifestarse a partir de los treinta días de desarrollo post-trasplante al tiempo que aparecen los primeros indicios de reconectividad, vascularización y madurez estructural, alcanzando su mejor expresión hacia los 60 días. Durante los primeros 15 días de desarrollo del trasplante, los sujetos no mostraron ningún indicio de recuperación en el paradigma del CAS, en tanto que las observaciones histológicas mostraron la presencia de neuronas poco desarrolladas, con escasas proyecciones y revascularización incipiente.

El análisis de los resultados obtenidos con las técnicas de Golgi e impregnación argéntica, reveló la presencia de un proceso gradual de desarrollo caracterizado por una reorganización neuronal, tanto en el tejido hospedero como en el trasplante, con una mayor densidad neuronal en el tejido transplantado.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Por su parte la lesión de línea quíntula para colinérgica, reveló que las neuronas de la línea pléica homóloga se portan una reacción pasiva para esta lesión durante el periodo de recuperación, tal como se observó en las lesiones efectuadas por Moll y Landner (1978) y de Sánchez-Pedoni y colaboradores (1978), así como por la línea pléica que juega un papel importante en el CAS, además, ciertos profeta en nuestro laboratorio indican que los trasplantes homólogos masculinados, que promueven la recuperación del aprendizaje en el CAS y en el sistema colinérgico (López-Carrón et al., 1980). Esto sugiere una participación colinérgica en la recuperación conductual mediada por los trasplantes dentro del CAS.

Como ya hemos mencionado, estudios farmacológicos han señalado reiteradamente el papel de la acetilcolina en un gran número de funciones cerebrales incluyendo el aprendizaje y la memoria (Dannott et al., 1985; Perry, 1980; Decker y McCaugh, 1981). Por otro lado, se sabe que el FCM promueve la sobrevivencia, crecimiento y capacidades funcionales de las neuronas colinérgicas del SNC del cerebro basal anterior (Gage et al., 1988; Dekker y Thal, 1988; Cuervo et al., 1988; Frim et al., 1988). La administración intraventricular de este factor, incrementa la sobrevivencia de las neuronas colinérgicas axotomizadas, tras la lesión del fornix (Kremer, 1987; Varen et al., 1988; Halli, 1988). Se ha reportado también que la administración de FCM embebido en gelatina reduce la tasa de mortalidad de las neuronas del septum medial, originada por lesiones de la línea-fornix (Otto et al., 1989). Claramente en nuestro modelo la aplicación aguda del FCM sólo no produjo recuperación funcional significativa a ninguno de los tiempos post-trasplante probados. En contraste, otros autores, usando diferentes modelos de aprendizaje y diferentes regiones cerebrales han encontrado recuperación tras la aplicación aguda del

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

POW a otros factores moleculares como un resultado de la expresión del transcritos (log) et al., 1987; G. Paratcha et al., 1987).

En nuestro estudio, la mejor recuperación de la habilidad para aprender la tarea de OAS fue observada cuando el POW se asoció con transplantes corticales homotípicos. Esto nos habla de que, si bien el POW está involucrado en los procesos de recuperación, no requiere, en este modelo, de la presencia de los transplantes homotípicos necesarios y/o de algún factor cortical esencial para la producción de la recuperación funcional. Asimismo, nuestros resultados señalan reiteradamente que la recuperación acelerada, mostrada en presencia del factor de crecimiento neuronal, se infra estrechamente asociada a la participación del sistema colinérgico en los procesos de integración neuroquímica de los transplantes. Estos resultados concuerdan en lo reportado por otros autores, quienes emplean diferentes modelos conductuales (Cacost et al., 1988; Will y Pallego, 1991).

Como podemos observar, este modelo constituye un ejemplo de recuperación funcional, en el que los transplantes de tejido cerebral fetal, juegan un papel no sólo de mediador anatómico, sino también como mediador químico (si pensamos en el transplante como un suministrador de factores tróficos a lo largo plazo, a los 45 días). Así pues investigación adicional es necesaria para conocer el papel real que juega el transplante de tejido cerebral fetal en este modelo.



# TRANSPLANTES HIPOTALAMICOS

**TRABAJO VII**

BRES 24190

## Fetal brain transplants induce recovery of male sexual behavior in medial preoptic area-lesioned rats

Raúl G. Paredes<sup>1,2</sup>, Ana Luisa Piña<sup>2</sup>, Juan Fernández-Ruiz<sup>2</sup> and Federico Bermúdez-Rattoni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Psicología, Universidad Anáhuac and <sup>2</sup>Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico D.F. (Mexico)

(Accepted 3 April 1990)

**Key words:** Sexual behavior; Medial preoptic area; Bilateral lesion; Fetal brain transplant; Tyrosine hydroxylase immunoreactivity

Male rats received bilateral lesions within the medial preoptic area which completely abolished sexual behavior. Hypothalamic fetal brain transplants gradually restored sexual behavior to prelesion levels by the 6th week after the transplant. Immunocytochemical analyses revealed tyrosine hydroxylase immunoreactivity neurons within the transplanted tissue. These results demonstrate that fetal brain transplants can restore an innate complex behavior in which no spontaneous recovery is observed.

The medial preoptic area (MPOA) plays a crucial role in the expression of male sexual behavior in several species. Bilateral lesions within this forebrain region disrupt sexual behavior and, when the lesions are sufficiently large, copulation is completely abolished<sup>20,26</sup>. The deficits in sexual behavior produced by bilateral MPOA lesions are not associated with pituitary-gonadal dysfunction or impairment of erectile and ejaculatory mechanisms<sup>21,27,29,39</sup>. Testosterone treatment and procedures known to induce sexual behavior, such as tail pinching, in sluggish male rats do not restore copulation in MPOA-lesioned rats<sup>8,21,27,39</sup>. Moreover, spontaneous recovery has not been detected in male rats tested up to 8 months after the MPOA lesion<sup>17</sup>.

Previous findings indicate that fetal brain transplants establish anatomical connections with the host brain and, under some conditions, restore deficits in motor and cognitive functions<sup>6,9,12,14,16,25</sup>. Transplantation of MPOA tissue of male neonatal rats into the MPOA of female littermates increases both feminine and masculine sexual behaviors of the recipients during adulthood<sup>3</sup>. This finding is consistent with that, which was first reported by Beach, indicating that female rats can spontaneously display male sexual behavior<sup>4,5</sup>, as well as the finding that hormonal and pharmacological treatments can enhance the masculine sexual behavior displayed by females<sup>34,37,38</sup>. It has also been shown that transplants of fetal raphe cells restore the facilitation of lordotic behavior produced by lesions of serotonin-containing fibers in the hypothalamus<sup>28</sup>. However, such effects last for only 8

weeks, which period coincides with the reinnervation of the hypothalamus by serotonin-containing fibres<sup>15</sup>. At most, these studies indicate that the transplant accelerates a spontaneous process. Similarly, hypothalamic fetal grafts placed in the third ventricle can restore the neuroendocrine function and fertility in senescent rats. However, in this case the transplant appears to function as a minipump since the recovery of the lost function is associated with an increase in the release of luteinizing hormone and testosterone<sup>22</sup>.

In the present study, the ability of fetal hypothalamic transplants to induce sexual behavior in MPOA-lesioned rats was evaluated. It has been shown that incerto-hypothalamic dopaminergic neurons are involved in the execution of sexual behavior<sup>7</sup> and voltammetric studies have shown an increase in dopamine release during copulation<sup>33</sup>. Similarly, dopaminergic neurotransmission plays an important role in the mechanisms that initiate sexual behavior<sup>1</sup>. Although several other neurotransmitters have been proposed to play a role in the mechanisms related to sexual behavior, dopamine is the one most closely associated with initiation and execution of that behavior. Therefore, immunocytochemistry for tyrosine hydroxylase (TH) was performed, in addition to acetylcholinesterase (AChE) and Nissl techniques.

Adult male Wistar rats weighing 250-350 g were maintained under a 12 h light-dark cycle and fed commercial rat pellets and tap water ad libitum. They were tested for sexual behavior 3 times, once weekly, with receptive females brought into estrous by hormone

Reprint requests: R. Paredes, Universidad Anáhuac, Escuela de Psicología, Apdo. Postal 10-884, 11000 Mexico 10 D.F., Mexico.  
Correspondence: F. Bermúdez-Rattoni, Instituto de Fisiología Celular, P.O. Box 70-600, 04510 Mexico D.F., Mexico.

treatment. A detailed description of the methodology used to observe sexual behavior can be found elsewhere<sup>2,30</sup>. The following parameters of sexual behavior were recorded: mount latency (time from introduction of the male until the first mount with pelvic thrusting); intromission latency (time from introduction of the male until the first mount with vaginal penetration); ejaculation latency (time from the first intromission until ejaculation); postejaculatory interval (time from ejaculation until the next intromission); number of mounts with pelvic thrusting; number of intromissions. Only those animals that ejaculated in each of the screening tests were used in the experiment. Under ether anesthesia male rats received bilateral lesions according to the following coordinates: anterior bregma, 0.9 mm lateral to the midline, and 7.0 mm below the dura level. A stainless-steel electrode, insulated except for the tip (0.5 mm), was connected to a Grass constant current unit, which in turn was connected to a Grass (S48) stimulator. Anodal current of 0.75 mA was applied for 30 s. Starting one week after the lesion, the animals were retested with receptive females at weekly intervals three times for sexual behavior in 1 h tests. Those animals that did not show any sexual behavior in any of the tests, received bilateral hypothalamic fetal transplants according to the following procedure. Seventeen-day-old fetuses were removed from the abdominal cavity of pregnant rats under barbiturate anesthesia (50 mg/kg). The brain was extracted and the fetal hypothalamus dissected. Solid blocks of tissue, about 2 mm<sup>3</sup>, were bilaterally placed with a Hamilton microsyringe (100  $\mu$ l) into the area where the previous lesion was done. The animals were then tested for sexual behavior as mentioned. One group of animals with sham lesions in the MPOA (sham; Sh-group) was observed for the same time.

At the end of the experiment, serial brain sections were processed with Nissl, immunocytochemical and acetylcholinesterase histochemistry techniques. Immunocytochemistry for TH was visualized using primary antibodies (from Eugene Tech International, Inc.) at a dilution of 1:500. The sections were developed with a rabbit IgG avidin-biotin immunoperoxidase kit (Vector Labs) after 8 days of incubation with the primary antibodies. The tissue was mounted with Permount and coverslips. The AChE histochemistry technique was according to Paxinos and Watson<sup>32</sup>.

Of the 17 animals that received bilateral transplants, 7 had healthy and well integrated transplants (graft; G-group). At the site of the implant an intense proliferation of cells and fibers was found. The transplants were clearly delineated from the host tissue and no necrosis was observed (see Fig. 2). No signs of transplanted tissue were found in 10 animals (without graft; WG-group).

The relatively high incidence in which transplanted tissue was not detected can be explained considering that large MPOA lesions destroyed the ventral boundaries of the brain. Thus, the graft could have been deposited outside the nervous tissue. It has been reported that extraparenchymal transplants located in ventricular cavities or in the subarachnoid space surrounding the hypothalamus survive transplantation only for short periods<sup>11</sup>. All the animals with successful brain grafts recovered sexual behavior while animals in which no transplanted tissue was detected did not show signs of sexual behavior even 15 weeks after the transplant. The transplanted (G-group) group showed a steady increase in the percentage of animals that reached ejaculation (Fig. 1b). From the 4th week on, there was no significant difference in the number of animals in the Sh- and G-group that achieved ejaculation. Only incomplete mounts in 3 different sessions were displayed by the WG-group (Fig. 1a). No other type of sexual behavior was displayed by these animals. As previously described<sup>17</sup>, a group of animals in which copulation was disrupted by MPOA lesion showed no signs of recovery even 15 weeks after the lesion (data not shown). Although the transplanted animals engage in sexual behavior, their motivation to do so was lower in comparison to the sham-lesioned animals, as can be seen in the great variability in the intromission latency displayed by these animals (Fig. 1d). Similar variability in mount latency was observed (Fig. 1c). In contrast, in the G-group the execution of the complete copulatory pattern, once the behavior was initiated, greatly improved with time, as is indicated by the reduction of ejaculation latencies (Fig. 1f). The number of intromissions necessary to achieve ejaculation showed no difference between the G- and the Sh-group (Fig. 1e). No differences were observed in testicular and seminal vesicle weight among the three groups of animals (Table I), suggesting no pituitary-gonadal dysfunction. Fig. 2 shows an example of the healthy bilateral transplant detected within the target area of the host brain in 5 animals. In 2 animals the transplant was located in the middle of the MPOA and made contact with both lateral preoptic areas of the host brain. AChE reactivity and immunoreactive TH neurons, were found within the transplants (Fig. 2c,d). Moreover, groups of TH cells were mainly found in the border of the transplant and host tissue (Fig. 2d). The graft of the only animal that did not show recovery of sexual behavior was located dorsal and anterior to the MPOA.

The recovery of sexual behavior in the transplanted group is similar to that observed in castrated rats after hormone treatment<sup>26</sup>; i.e., mounting returned first, followed by intromission and ejaculation. However, neither the lesion nor the transplant appears to alter endocrine function as reflected by the lack of effects on testicular

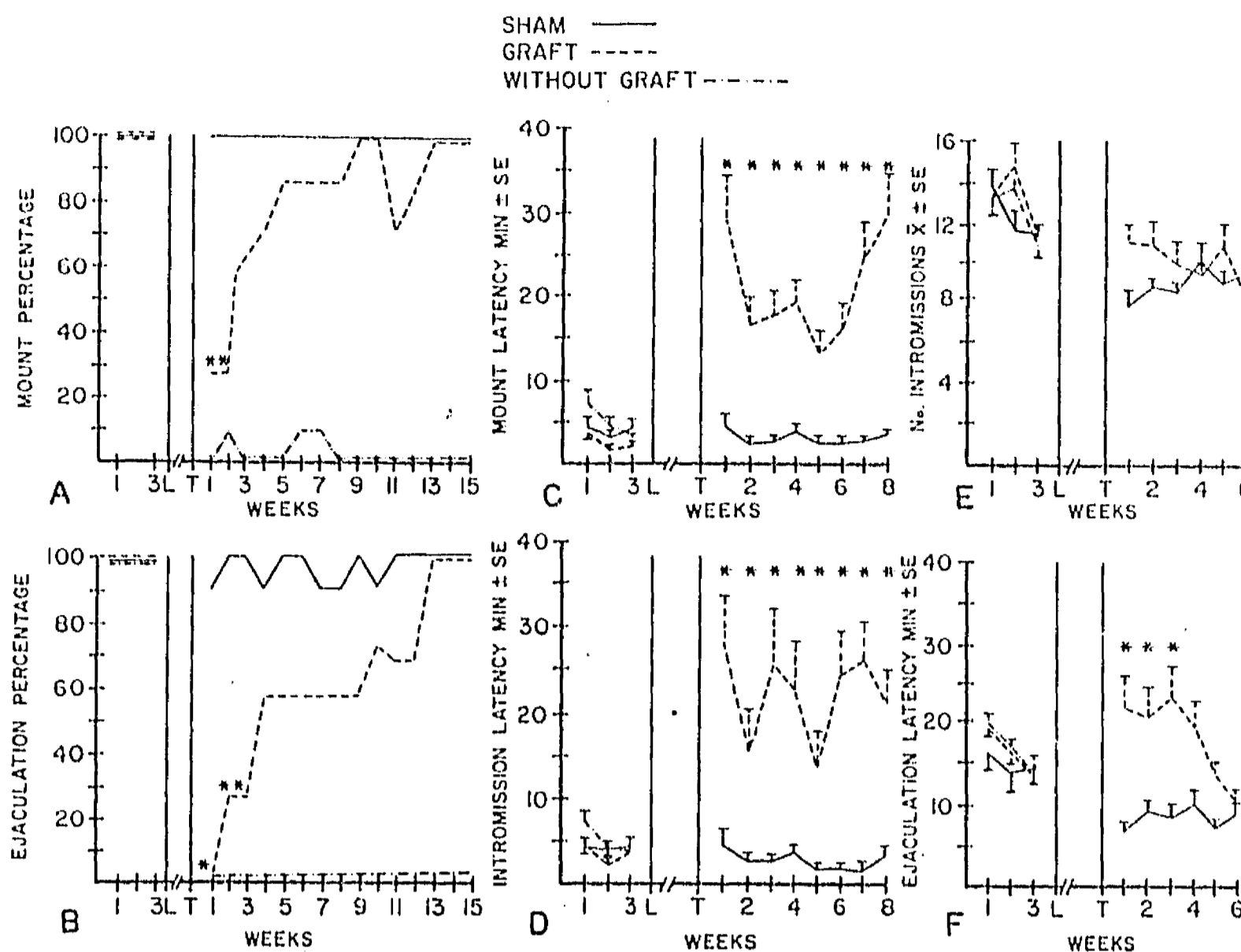


Fig. 1. Parameters of sexual behavior in Sh-group ( $n = 10$ ), G-group ( $n = 7$ ), WG-group ( $n = 10$ ). Bilateral hypothalamic transplants (T) were placed within the lesion site in animals that showed no sexual behavior in three postlesion tests (L). a: percentage of animals displaying mounts. b: percentage of animals reaching ejaculation during the 15 weeks following the graft. \* Different from sham ( $P < 0.05$ ) Fisher's exact probability test. In order to compare mount, intromission and ejaculation latencies, the first session post-transplant or post-sham lesion in which the behavior was displayed, was considered as week one for each group. The WG-group did not display the behavior, therefore no data was obtained; (c) mount latency; (d) intromission latency; (e) number of intromissions preceding ejaculation; (f) ejaculation latency. \* Different from sham ( $P < 0.05$ )  $t$ -test.

and seminal vesicle weight (Table I). Therefore, the possibility that the transplant induced sexual behavior by stimulating the pituitary gonadal function can be rejected. To our knowledge there is only one study that reported that sexual behavior was partially and temporarily restored in MPOA-lesioned rats<sup>19</sup>. In that study, male rats bearing lesions in the MPOA were injected i.p. with lisuride (semi-synthetic ergoline) on 4 consecutive days. Only 50% of the rats displayed the full mating pattern and sexual behavior disappeared immediately when treatment with lisuride was discontinued. Moreover, the results are difficult to interpret since lisuride interacts with different neurotransmitters including nor-

adrenaline, serotonin and dopamine<sup>10,23,24,35</sup>. In the present study all the animals in which grafted tissue was detected displayed sexual behavior. Furthermore, once each animal recovered the ability to engage in sexual behavior, the copulatory pattern was displayed consistently until the end of the experiment suggesting a long-lasting effect of the transplant. Since no other treatment examined to date has fully restored sexual behavior in MPOA-lesioned rats and since spontaneous recovery does not occur in such animals, it could be argued that the functional connectivity between the transplanted tissue and the host brain is responsible for the recovery of sexual behavior. Studies designed to test this possibility are currently being undertaken in our laboratory. Further support for this hypothesis can be obtained considering the fact that an apparently well integrated graft located just outside the MPOA did not induce recovery of sexual behavior. Similar specificity of localization has been described in a recent study in which kindling, an electrical model of epilepsy, was used to induce sexual behavior in noncopulating male rats. In that study, repeated electrical stimulation of the MPOA induced sexual behavior in noncopulating male rats. However, the stimulation electrode had to be well within

TABLE I

Testicular and seminal vesicles weight (in grams) in the sham (Sh-group); the graft (G-group) and the without-graft group (WG-group)

Values are mean  $\pm$  S.E.M.

	Sh-group	G-group	WG-group
Testicles	3.65 $\pm$ 0.22	3.21 $\pm$ 0.85	3.23 $\pm$ 0.15
Seminal vesicles	0.94 $\pm$ 0.10	0.85 $\pm$ 0.12	0.98 $\pm$ 0.09

the MPOA in order to induce sexual behavior<sup>31</sup>.

Different explanations have been put forth to explain the mechanisms by which sexual behavior is disrupted after lesions in the MPOA. It has been observed that male rats with lesions in this area showed less preference for a receptive female than that shown by control males. This preference declines even further in lesioned males as testing is extended and is not affected by testosterone treatment, suggesting that mating is decreased in MPOA-lesioned rats by a decrease in sexual motivation<sup>13</sup>. There

is much data suggesting that reduced motivation is not the only consequence of MPOA lesions. Indeed, some studies suggest that the lesions leave sexual motivation unaffected. Since precopulatory behaviors persist in male rats after MPOA lesions (see above) it has been postulated that the performance mechanisms of sexual behavior are impaired. Moreover, incomplete mounts have been observed in MPOA-lesioned rats<sup>18,19,21</sup>. Similarly, male rhesus monkeys with lesions in this area will not copulate but continued to masturbate and lever-press

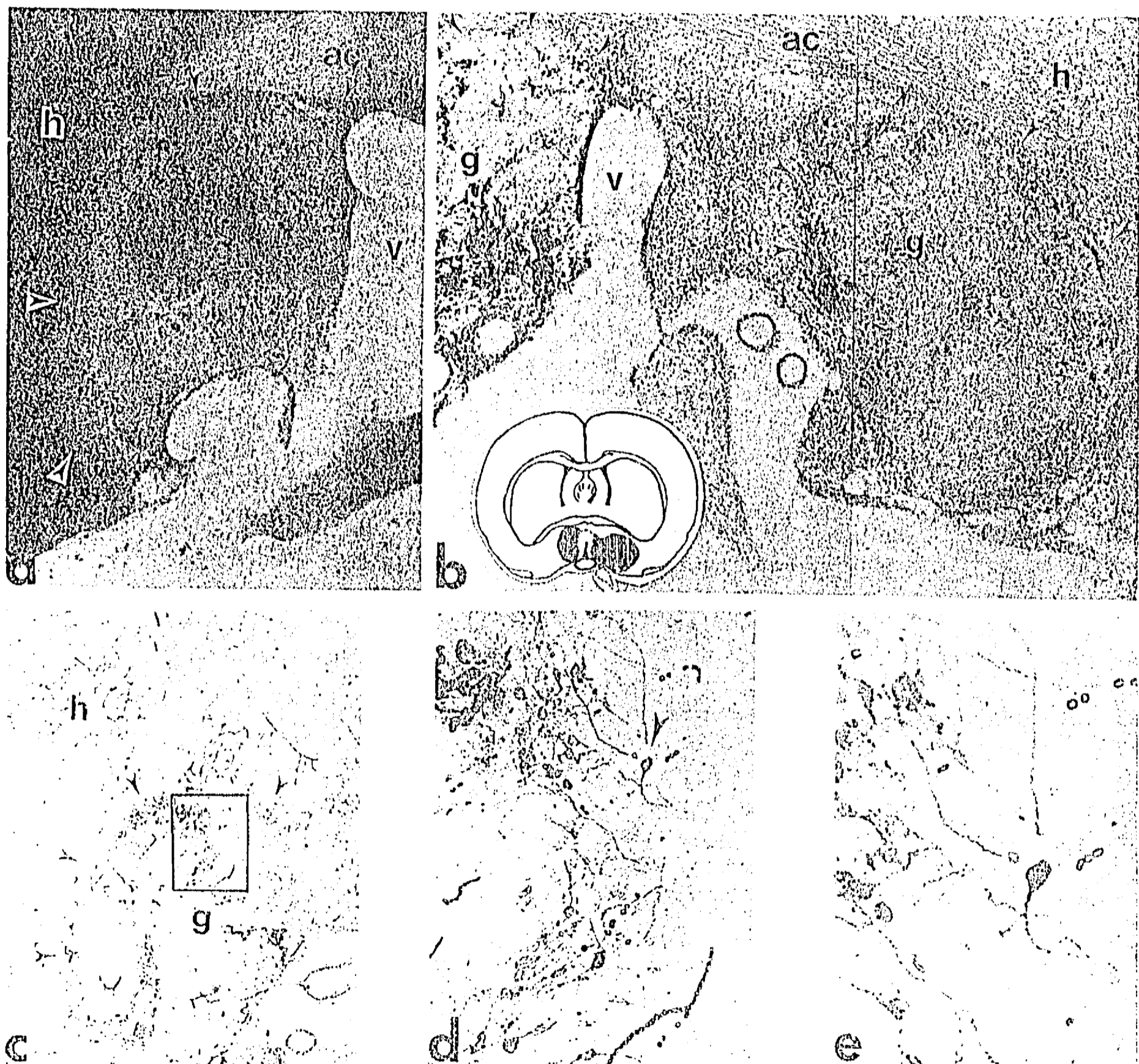


Fig. 2. a: cholinesterase histochemistry in a coronal section of MPOA. Arrows show the border of the graft (g). Observe the strong positive reaction of the host tissue (h). The grafted tissue showed patches and isolated positive cells to the histochemistry ( $\times 34$ ). b: representative hypothalamic graft stained with Cresyl violet. Arrows show the limit between graft (g) and host (h) tissue, in both sides of the ventricle (v). Note the integration of the graft with the host tissue ( $\times 34$ ). There is also a schematic representation of the location of the graft in the MPOA region. c: hypothalamic graft with positive immunoreaction for tyrosine hydroxylase (TH;  $\times 34$ ). d: is a magnification from the square in c (arrow indicates a TH-immunoreactive neuron,  $\times 200$ ). e: is a magnification of the TH-immunoreactive neuron from d ( $\times 400$ ). g, graft; h, host tissue; ac, anterior commissure.

te  
af  
no  
in  
in  
ce  
th

M  
m  
is  
be  
ce  
re  
ac  
is  
ex  
pa

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15



is it  
so...e  
vation  
in the  
b. n  
sexual  
not as  
. S a-  
ca will  
-p-ss

to obtain the company of a female<sup>36</sup>. It is suggested that after the lesion the animal is unable to perform the normal pelvic thrusting pattern associated with mounting<sup>18</sup>. A third hypothesis considers that the MPOA is involved in the mechanisms related to the initiation of copulation and also in those related to the execution of the behavior itself<sup>17,40</sup>.

Our data agrees with the hypothesis suggesting that MPOA lesions impair both motivational and performance mechanisms of sexual behavior<sup>17,40</sup>. If the MPOA is involved only in the mechanisms that initiate sexual behavior<sup>13</sup>, a parameter related to the execution of copulation (ejaculation latency) would not have shown a recovery as the time after the transplant increased, as actually occurred (see Fig. 1f). In contrast, if the MPOA is involved only in the mechanisms related to the execution of sexual behavior<sup>18,19</sup>, no alteration in the parameters related to the initiation of copulation (mount

and intromission latency) would have been expected once the behavior was re-established. Our results indicated that the motivation remained reduced during the 15 weeks following the graft. Therefore, it appears that the transplant is incapable of completely restoring sexual motivation. It is possible then, that the MPOA functions as an interface between the mechanisms that initiate sexual behavior and those that will lead to ejaculation.

Currently we are engaged in the analysis of the functional development of grafted tissue, associated with a detailed behavioral analysis to elucidate both mechanisms of action of the transplants and those underlying the expression and execution of sexual behavior.

\* This project was partially supported by CONACyT PEXCNA-050290. We thank Mr. Mario Diaz for his excellent technical assistance and Mrs. Maria Teresa Torres for preparing the manuscript.

- 1 Agmo, A. and Fernandez, H., Dopamine and sexual behavior in the male rat: a reevaluation, *J. Neural Transm.*, 77 (1989) 21-37.
- 2 Agmo, A. and Paredes, R., Opioids and sexual behavior in the male rat, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 30 (1988) 1021-1034.
- 3 Arendash, G.W. and Gorski, R.S., Enhancement of sexual behavior in female rats by neonatal transplantation of brain tissue from males, *Science*, 217 (1986) 1276-1278.
- 4 Beach, F.A., Sex reversal in the mating pattern of the rat, *J. Genet. Psychol.*, 53 (1938) 329-334.
- 5 Beach, F.A., Execution of the complete masculine copulatory pattern by sexually receptive female rats, *J. Genet. Psychol.*, 60 (1942) 137-142.
- 6 Bermudez-Rattoni, F., Fernandez, J., Sanchez, M.A., Aguilar-Roblero, R. and Drucker-Colin, R., Fetal brain transplants induce recuperation of taste aversion learning, *Brain Research*, 416 (1987) 147-152. A2.
- 7 Bitran, D., Hull, E.M., Holmes, G.M. and Lookingland, K.J., Regulation of male rat copulatory behavior by preoptic incertohypothalamic dopamine neurons, *Brain Res. Bull.*, 20 (1988) 323-331.
- 8 Caggiula, A.R., Antelman, S.M. and Zigmond, M.S., Ineffectiveness of sexually arousing stimulation after hypothalamic lesions in the rat, *Physiol. Behav.*, 12 (1974) 313-316.
- 9 Colier, T., Gash, D. and Sladek Jr., J., Transplantation of norepinephrine neurons into aged rats improves performance of a learned task, *Brain Research*, 448 (1988) 77-87.
- 10 Cote, T., Munemura, M. and Keabian, J., Lisuride hydrogen maleate: an ergoline with  $\beta$ -adrenergic antagonist activity, *Eur. J. Pharmacol.*, 59 (1979) 303-306.
- 11 Das, G.D., Extraparenchymal neural transplants: their cytology and survivability, *Brain Research*, 241 (1982) 182-186.
- 12 Dunnet, S., Low, W., Iversen, S., Stenevi, U. and Björklund, A., Septal transplants restore maze learning in rats with fornix-fimbria lesions, *Brain Research*, 251 (1982) 335-348.
- 13 Edwards, D.A. and Einhorn, L.C., Preoptic and midbrain control of sexual motivation, *Physiol. Behav.*, 37 (1986) 329-335.
- 14 Escobar, M., Fernandez, J., Guevara-Aguilar, R. and Bermudez-Rattoni, F., Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion, *Brain Research*, 478 (1989) 368-374.
- 15 Frankfurt, M. and Azmitia, E., Regeneration of serotonergic fibers in the rat hypothalamus following unilateral 5,7-dihydroxytryptamine injection, *Brain Research*, 298 (1984) 273-282.
- 16 Gage, F.H., Dunnett, S.B., Stenevi, U. and Björklund, A., Aged rats: recovery of motor impairments by intrastriatal nigral grafts, *Science*, 221 (1983) 966-969.
- 17 Ginton, A. and Merari, A., Long range effects of MPOA lesion on mating behavior in the male rat, *Brain Research*, 120 (1977) 158-163.
- 18 Hansen, S. and Drakefjagelsrum, L.J., Emergence of displacement activities in the male rat following thwarting of sexual behavior, *Behav. Neurosci.*, 98 (1984) 868-883.
- 19 Hansen, S., Kohler, Ch., Goldstein, M. and Steinbusch, H.V., Effects of ibotenic acid-induced neuronal degeneration in the medial preoptic area and the lateral hypothalamic area on sexual behavior in the male rat, *Brain Research*, 239 (1982) 213-232.
- 20 Hart, B.L. and Leedy, M.G., Neurological basis of male sexual behavior: a comparative analysis. In N. Adler, D. Pfaff and R.W. Goy (Eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology*, Vol. 2, Plenum, New York, 1985, pp. 373-422.
- 21 Heimer, L. and Larsson, K., Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic-anterior hypothalamic continuum, *Brain Research*, (1966/1967) 248-263.
- 22 Huang, H.H., Kissane, J.Q. and Hawlylewicz, E.J., Restoration of sexual function and fertility by fetal hypothalamic transplant in impotent aged male rats, *Neurobiol. Aging*, 8 (1987) 465-472.
- 23 Keabian, J.W. and Keabian, P.R., Lergotriole and lisuride: in vivo dopaminergic agonists which do not stimulate the presynaptic dopamine autoreceptor, *Life Sci.*, 23 (1978) 2199-2204.
- 24 Keller, H.H. and DaPrada, M., Central dopamine agonistic activity and microsomal biotransformation of lisuride, lergotriole and bromocriptine, *Life Sci.*, 24 (1977) 1211-1222.
- 25 Labbe, R., Firl, A., Mufson, E.J. and Stein, O.G., Fetal brain transplants reduction of cognitive deficit in rats with frontal cortex lesions, *Science*, 221 (1983) 470-472.
- 26 Larsson, K., Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In C. Beyer (Ed.), *Endocrine Control of Sexual Behavior*, Raven, New York, 1979, pp. 77-163.
- 27 Lisk, R.D., Copulatory activity of the male rat following placement of preoptic-anterior hypothalamic lesions, *Exp. Brain Res.*, 5 (1968) 306-313.
- 28 Luine, V.N., Renner, K.J., Frankfurt, M. and Azmitia, E., Facilitated sexual behavior reversed and serotonin restored by raphe nuclei transplanted into denervated hypothalamus, *Science*, 226 (1984) 1436-1438.
- 29 Lupo, C., Dessi-Fulgheri, F., Musi, B. and Larsson, K., The effect of medial preoptic-anterior hypothalamic lesions on

ing positive  
representative  
ntricle (v).  
he POA  
qu e in c  
aft; h, host

- testosterone plasma levels and testosterone conversion in the hypothalamus of male rats, *Neurosci. Lett.*, 39 (1983) 261-265.
- 30 Paredes, R. and Agmo, A., Stereospecific actions of baclofen on sociosexual behavior, locomotor activity and motor execution, *Psychopharmacology*, 97 (1989) 358-364.
- 31 Paredes, R., Haller, A.E., Manero, M.C., Alvarado, R. and Agmo, A., Medial preoptic area kindling induces sexual behavior in sexually inactive male rats, *Brain Research*, in press.
- 32 Paxinos, G. and Watson, Ch., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York, 1982.
- 33 Pfaus, J.G., Newton, T.N., Blaha, C.D., Fibiger, H.C. and Phillips, A.G., Electrochemical detection of central dopamine efflux during sexual activity in male rats, *19th Annu. Meeting Soc. Neurosci.*, Phoenix Arizona, 1989.
- 34 Rodriguez-Sierra, J., Naggar, A. and Komisaruk, B., Monoaminergic mediation of masculine and feminine copulatory behavior in female rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 5 (1976) 457-463.
- 35 Silbergeld, E.K., Hruska, R.E., Weir, R. and Kennedy, J.W., Dopaminergic and serotonergic effects of ergot drugs. In K. Fuxe and D.B. Calne (Eds.), *Dopaminergic Ergot Derivates and Motor Function*, Pergamon, New York, 1979, pp. 223-235.
- 36 Slimp, J.C., Hart, B.L. and Goy, R.W., Heterosexual, auto-sexual and social behavior of adult male rhesus monkeys with medial preoptic-anterior hypothalamic lesions, *Brain Research*, 142 (1978) 105-122.
- 37 Sodersten, P., Mounting behavior in the female rat during the estrous cycle, after ovariectomy, and after estrogen or testosterone administration, *Horm. Behav.*, 3 (1972) 307-320.
- 38 Sodersten, P., Increased mounting behavior in the female rat following a single neonatal injection of testosterone propionate, *Horm. Behav.*, 4 (1973) 1-17.
- 39 Stefanick, M. and Davidson, J.M., Genital responses in noncopulators and rats with lesions in the medial preoptic area or midthoracic spinal cord, *Physiol. Behav.*, 41 (1987) 439-444.
- 40 Szechtman, H., Caggiula, A.R. and Wolkan, D., Preoptic knife cuts and sexual behavior in male rats, *Brain Research*, 150 (1978) 569-591.



**TRABAJO VIII**

BRES 25779

## Hypothalamic but not cortical grafts induce recovery of sexual behavior and connectivity in medial preoptic area-lesioned rats

Raúl G. Paredes<sup>a,b</sup>, Ana Luisa Piña<sup>b</sup> and Federico Bermúdez-Rattoni<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Escuela de Psicología, Universidad Anáhuac and <sup>b</sup> Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México DF (Mexico)

(Accepted 18 May 1993)

**Key words:** Sexual behavior; Medial preoptic area; Fetal brain transplant; Retrograde tracer; Fluorogold; Lisuride

We have previously shown that hypothalamic fetal brain grafts induced recovery of sexual behavior in medial preoptic area (MPOA)-lesioned male rats. In the present series of experiments, male rats with completely abolished sexual behavior by MPOA lesions received either hypothalamic or frontal cortical fetal grafts. The animals that received hypothalamic grafts showed a gradual recovery of sexual behavior. In contrast, those animals who received cortical grafts did not recover sexual behavior during the 15 weeks after the graft. In addition, to evaluate the connectivity of the grafted tissue with the host brain, a retrograde tracer, fluorogold, was injected in the dorsal tegmental area. Fluorogold-labeled cells were found in the hypothalamic, but not in the cortical grafts. These results suggest that specificity of the grafted tissue and connectivity between brain grafts and host tissue are necessary for the recovery of male sexual behavior in MPOA-lesioned rats.

It is well established that the medial preoptic area (MPOA) is involved in the control of male sexual behavior in several species. Large bilateral lesions of the MPOA eliminate male sexual behavior<sup>9</sup>. Similarly, bilateral lesions of the dorsolateral tegmentum (DLT) abolish sexual behavior<sup>4</sup>. Moreover, when unilateral MPOA lesion was combined with a lesion of the contralateral DLT, sexual behavior was also eliminated. These results suggest that the connections between the MPOA and the DLT are essential for the expression of male sexual behavior<sup>4</sup>. Spontaneous recovery has not been detected in male rats tested up to 8 months after MPOA lesions<sup>7</sup> and up to 4 months after DLT lesions (R.G. Paredes et al., unpublished data). The last results indicate that the deficits in sexual behavior produced by lesions of MPOA or DLT are permanent and give further support to the hypothesis that those structures are involved in the control of male sexual behavior.

We have previously shown that hypothalamic fetal brain grafts can induce the recovery of copulation in male rats bearing MPOA electrolytic lesions<sup>15</sup>. The grafts produced a gradual recovery of the behavior, i.e. mounting returned first, followed by intromission and

ejaculation. However, the implants appeared incapable of completely restoring sexual motivation since the mount and intromission latencies remained significantly prolonged in comparison with prelesion levels and to an intact group of animals. Moreover, in the same study, an apparently well-integrated graft found outside the MPOA did not induce recovery of sexual behavior. It was suggested that functional connectivity between the grafted and host tissue could be involved in the recovery of sexual behavior induced by fetal hypothalamic grafts<sup>15</sup>.

In this report, we demonstrate that the recuperation of the lost ability to express sexual behavior due to MPOA lesions is possible with hypothalamic but not with cortical fetal brain grafts. In addition, we demonstrated, using fluorogold retrograde tracing technique that hypothalamic but not cortical grafts are able to reestablish connectivity with those areas that have been described as having normal connections with the MPOA.

Adult male Wistar rats (250–350 g) were tested for sexual behavior with receptive females brought into estrous by hormone treatment to assure receptivity. The females were injected with estradiol benzoate (25

$\mu\text{g}/\text{rat}$ ; Sigma) 52–56 h and with progesterone (1 mg/rat; Aldrich) 4–6 h before behavioral observation. Three 1-h screening tests were performed once weekly. The following parameters of male sexual behavior were recorded: latency to the first mount and intromission, ejaculation latency, number of mounts and intromissions. Only those males that ejaculated in the three 30-min tests were used in the experiment. 1 week after

the third screening test, the animals received bilateral electrolytic lesions. Under deep ether anesthesia, a stainless steel electrode, insulated except for the tip (0.5 mm), was aimed at the MPOA according to the following coordinates: anterior bregma, 0.7 mm lateral to the midline and 7.0 mm below the dura level<sup>13</sup>. Anodal current of 0.65 mA for 30 s was applied through a Grass (5A) lesion maker. Starting 1 week after the

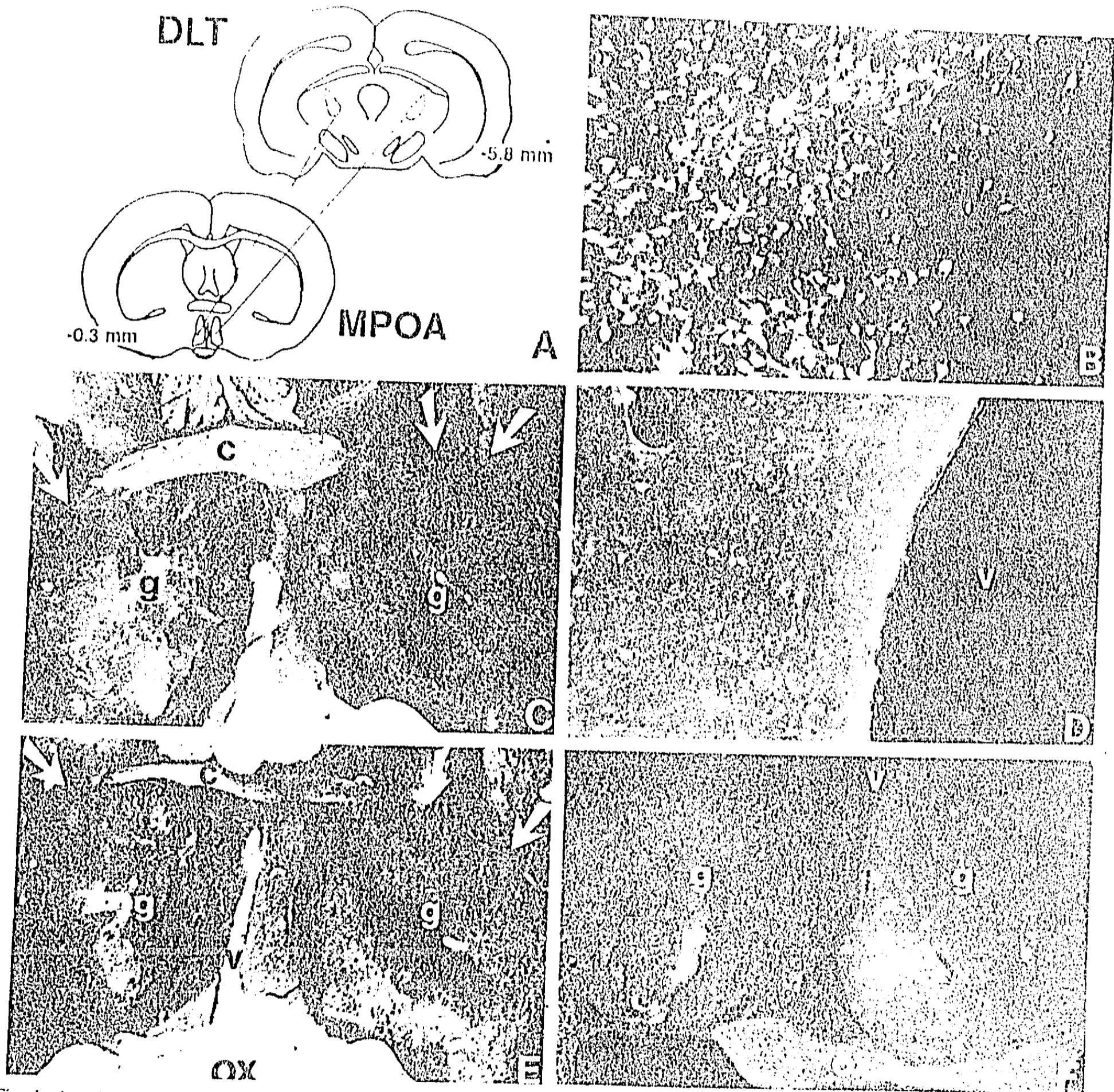


Fig. 1. A: schematic representation of fluorogold bilateral injections in DLT and retrogradely labeled neurons within MPOA. B: MPOA fluorogold-labeled cells in an intact animal (200 $\times$ ). C: cholinesterase histochemistry in a coronal section of MPOA. Arrows show border of hypothalamic graft (g). Grafted tissue showed patches and isolated positive cells to histochemistry (20 $\times$ ). D: fluorogold-labeled cells in a hypothalamic graft (200 $\times$ ). v, ventricle. E: representative bilateral frontal cortex grafts (g) with histochemistry for cholinesterase. Note integration of graft with host tissue. Arrows show border between cortical graft and host tissue (20 $\times$ ). F: a view of cortical grafts (g) with UV light; note absence of labeled cells (20 $\times$ ). ox, optic chiasm; c, anterior commissure.

bilateral  
thetia, a  
the tip  
g the  
n lateral  
level<sup>11</sup>.  
d though  
after the



MPOA  
ords of  
lls in a  
e. Note  
with IV

lesion, the animals were retested for sexual behavior with receptive females. Three 1-h tests, once weekly, were performed. During the last test after the lesion, the females were routinely exchanged and in the last 30 min the males' tail pinched every 5 min. This procedure induces sexual behavior in sluggish male rats<sup>12</sup> and was used to further assess the effect of the lesion<sup>5</sup>. Those males that did not show any sexual behavior in any of the tests received bilateral hypothalamic or frontal cortex implants. Under chloral hydrate anesthesia (250 mg/kg), 17-day-old fetuses were removed from the abdominal cavity of pregnant rats. The brain was extracted and the fetal hypothalamus or frontal cortex dissected. Using a Hamilton microsyringe (100  $\mu$ l), blocks of tissue, about 2 mm<sup>3</sup>, were bilaterally placed where the previous lesions were done. The animals were then tested once weekly for 15 weeks as described above. 12 hypothalamic grafted animals that did not recover sexual behavior received i.p. injections of lisuride during 5 consecutive days. It has been reported that repeated administration of lisuride in MPOA-lesioned rats restores sexual behavior<sup>8</sup>. The drug was dissolved in physiological saline and injected in a dose of 0.1 mg/kg in a volume of 1 ml/kg. On the last day of the injection, the drug was administered 15 min before behavioral observation. The test lasted 1 h. The treatment of lisuride was preceded and followed by an identical treatment with physiological saline.

At the end of the experiment, seven grafted animals (three hypothalamic, four cortical) were injected in the

DLT with the retrograde tracer fluorogold. Fluorogold (0.7  $\mu$ l; Fluorochrome, USA) was bilaterally administered through a Hamilton microsyringe according to the following coordinates: -5.5 mm from bregma, 2.0 mm lateral to the midline and 6.5 mm below the dura. 1 wk after the fluorogold injection, the animals were sacrificed and perfused with a solution of paraformaldehyde (4%) and glutaraldehyde (0.1%) in PBS (pH 7.4, 0.15 M saline, 0.1 M phosphates). Then, with a microtome, 40- $\mu$ m sections were cut and mounted in gelatin-covered slides and then observed directly under a fluorescent microscope. Quantification of labeled cells was done in each side of four histological sections from each grafted or control animals. The cell quantification was made with the aid of a computer program developed by Alvarez-Buylla and Vicario<sup>1</sup>. Other serial brain sections were processed with Nissl or acetylcholinesterase histochemistry techniques. The proportion of animals displaying mounts, intromissions and ejaculations in the hypothalamic and cortical grafts groups was compared by Fisher's exact probability test. Probabilities indicated are one-tailed since the change could be only in one direction. The area and the number of cells/area were analysed by Kruskal-Wallis ANOVA followed by the Mann-Whitney *U*-test.

Of the 27 animals that received bilateral hypothalamic fetal brain grafts, nine of them had healthy and apparently well-integrated grafts. The transplants were clearly delineated from the host tissue (Fig. 1). The nine animals in which bilateral hypothalamic grafts were

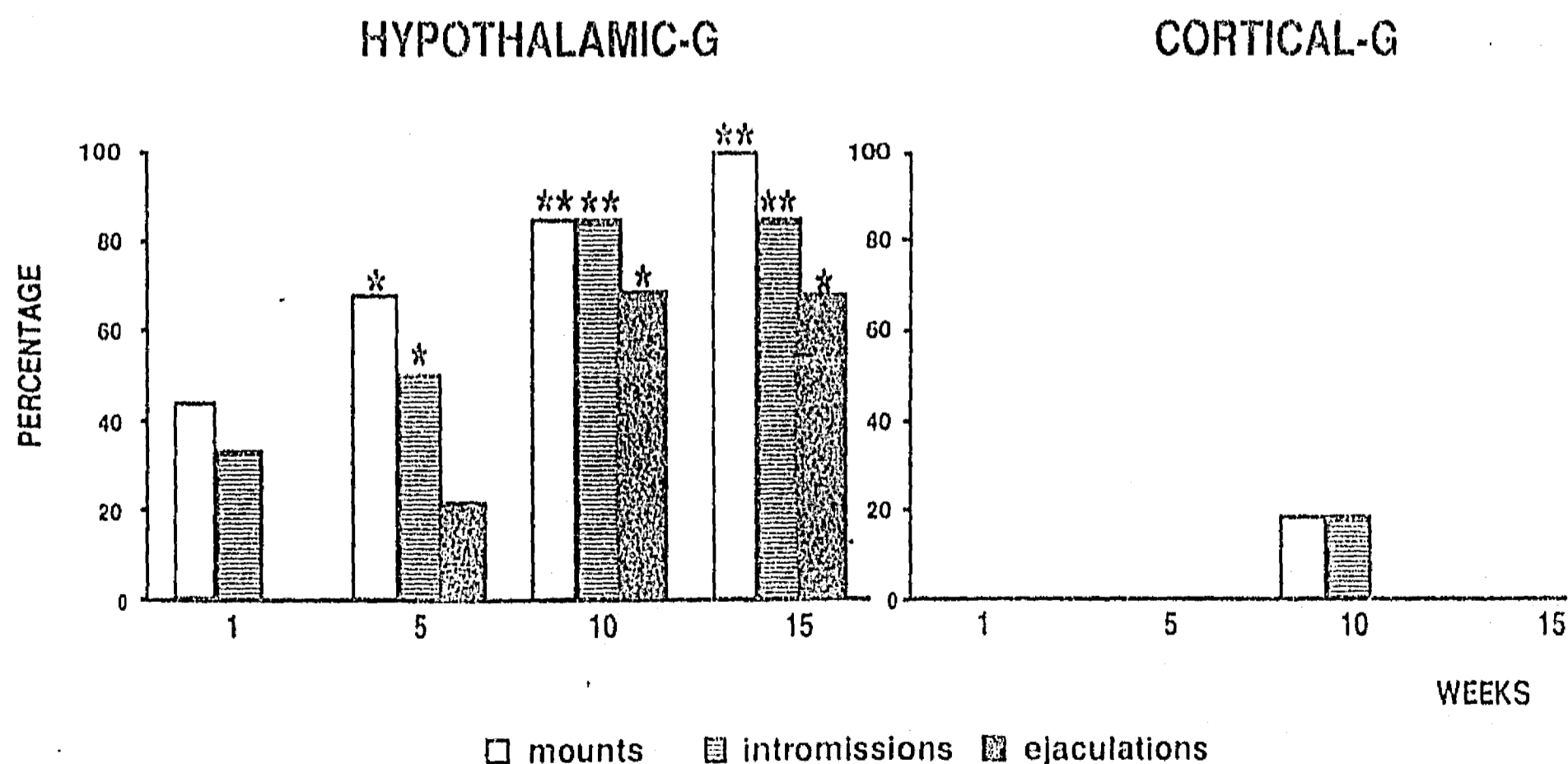


Fig. 2. Percentage of grafted animals displaying mounts, intromissions and ejaculation in tests after graft. Comparisons were made by pairwise Fisher's exact probability test. Probabilities are one-tailed since changes could be in only one direction. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  vs. CORTICAL-G group.

TABLE 1

Result of the image analysis taken from the MPOA, hypothalamic and cortical grafts areas that show the number of Fluorogold-labelled cells per area

	MPOA	Hypothalamic grafts	Cortical grafts
Area occupied by (mm <sup>2</sup> ) (S.E.M.)	0.45 (0.08)	1.77 * (0.31)	2.85 * (0.51)
Number of fluorogold-labeled cells/area (S.E.M.)	150.75 (37.3)	21.89 * (7.39)	0.39 ** (0.09)

\*  $P < 0.05$  vs. control group (MPOA), Mann-Whitney  $U$ -test. \*  $P < 0.05$  vs. HYPOTH-G group, Mann-Whitney  $U$ -test.

detected showed the steady recovery of sexual behavior (Fig. 2). Mounts returned first, followed by intromissions and ejaculations. In 16 animals, transplanted tissue was not found. Of these 16 animals, 12 were treated with lisuride and only one displayed sexual behavior. The other two hypothalamic grafted animals had a unilateral transplants located in the dorsal MPOA and did not recovered sexual behavior.

Of the 12 animals that received frontal cortex transplants, seven of them had healthy and apparently well-integrated grafts (Fig. 1). However, none recovered sexual behavior, even 15 weeks after the graft. Only one animal mounted and displayed intromissions in one of the tests (Fig. 2). In four animals, no signs of frontal cortical grafts could be detected. Another animal became ill 10 weeks after the transplant and was sacrificed.

Of the seven animals injected with fluorogold, five showed a healthy and well-integrated grafts, two animals without grafted tissue were rejected from further analysis. In three animals with homotopic grafts, fluorogold-labeled cells were clearly identified although a reduced number of labeled cells were found when compared with intact controls (Table 1). In the two heterotopic grafted animals, a very scarce fluorogold-labeled cells were detected within the graft. Quantification of number of cells/area showed a significant reduction in both transplanted groups with respect to the intact animals. Moreover, the hypothalamic grafts had a significantly higher number of cells/area than the cortical grafts. These results suggest that the homotopic, but not the heterotopic, grafts establish anatomical connections with the DLT area of the host.

The results of the present study confirm previous observations showing that hypothalamic fetal brain grafts can induce a gradual recovery of sexual behavior in MPOA-lesioned male rats<sup>15</sup>. Mounts returned first followed by intromissions and ejaculation. In contrast, frontal cortical grafts did not induce the recovery of

sexual behavior in MPOA-lesioned animals. The histological analyses revealed that the cortical grafts were healthy and well integrated and appear to grow more than the hypothalamic grafts (Table 1). These results suggest that at least some specificity is needed in the grafted tissue to induce recovery of sexual behavior. Moreover, animals with unilateral hypothalamic transplants or with grafts located outside the MPOA<sup>15</sup> did not recover sexual behavior. It has been demonstrated that testosterone treatment does not restore copulation in MPOA-lesioned rats<sup>9</sup>. Further, deficits in sexual behavior produced by lesions of the MPOA are not associated with pituitary-gonadal dysfunction<sup>9,15</sup>. Taking together these observations, they suggest that neither trophic nor humoral factors are associated with the recovery of sexual behavior induced by hypothalamic grafts after lesions of the MPOA.

If humoral and trophic influences are discarded, the most plausible explanation is that neural connections between the grafted tissue and the host brain are necessary for the recovery of sexual behavior. This hypothesis is supported by the observation that fluorogold-labeled cells were found within the hypothalamic but not in the cortical grafts after this retrograde tracer was injected in the DLT. As described in the introduction, the connections between the MPOA and the DLT appear to be crucial for the expression of sexual behavior<sup>4</sup>. In the present study, hypothalamic grafts re-established connectivity with the DLT and recovered sexual behavior. In contrast, frontal cortical grafts did not recover the behavior and no connectivity was detected between the graft and the DLT. The number of fluorogold-labeled cells found in the hypothalamic grafts were much less than those normally seen in the intact animals, however, they appear to be enough to induce behavioral recovery. Further studies are needed to determine if the connections between the MPOA and the DLT are the only variable responsible for the graft-induced recovery. Connectivity between the graft and the host tissue has been described on other models of fetal brain grafts. For example, we have demonstrated that the recovery of taste aversion learning is associated with both the grafted tissue specificity<sup>3</sup> and the re-establishment of neural connections<sup>6</sup>.

As mentioned, it has been reported that i.p. injections of lisuride temporally induced sexual behavior in 50% of animals with MPOA lesions<sup>8</sup>. In the present study, a similar treatment with lisuride did not induce sexual behavior in animals with MPOA lesions in which histological examination revealed no signs of transplanted tissue. One possible explanation for the differences observed between the two studies is that in the Hansen et al.<sup>8</sup> study the lisuride treatment began 10

day  
wit  
sex  
po  
the  
tra  
lat  
ing

rec  
re-  
na  
inc  
tic  
be  
mi  
to  
he  
al  
TI  
gr  
m  
h  
th  
ve  
of  
la  
M  
n  
It  
SI  
c  
n

T  
a  
9



days after the lesion. In our study, the animals treated with lisuride were injected after 15 weeks in which no sexual behavior was displayed and, therefore, the temporal effects of the lesion had passed. In contrast to the temporal effects described after lisuride administration<sup>8</sup>, once the hypothalamic-grafted animals copulated, they consistently displayed the behavior, suggesting that the effects of the graft are permanent.

Different graft models have been used to study the recovery of reproductive functions. For example, the re-establishment of reproductive capacities in hypogonadal mice<sup>11</sup> and aged rats<sup>10,17</sup> is associated with an increase in the hypothalamic-hypophysis-gonadal function. In contrast, the induction of masculine sexual behavior displayed by females, produced by hypothalamic grafts<sup>2</sup>, appears associated to some humoral factors. This is supported by the observation that hormonal<sup>18,19</sup> and pharmacological treatments<sup>16</sup> can also induce masculine sexual behavior in female rats. The normalization of lordotic behavior produced by grafts of fetal raphe cells into a lesioned hypothalamus<sup>13</sup> appears to be associated also to the release of humoral factors produced by the graft. In this model, the disruption of lordotic behavior is eventually reversed without any treatment, suggesting that the grafts only accelerate a spontaneous process<sup>13</sup>. The hypothalamic graft-induced recovery of sexual behavior in MPOA-lesioned rats represents a model to study the mechanisms involved in the control of sexual behavior. It also represents a fetal brain graft model in which no spontaneous recovery is observed and in which the connectivity between the graft and host tissue appears necessary to produce functional recovery.

The present research was supported by DGAPA-UNAM IN 204689 and 204891, CONACYT 0178-N9107 and PADEP-UNAM DCCII-9177. We thank O. Carbajal for his technical assistance.

- 1 Alvarez-Buylla, A. and Vicario, D.S. Simple microcomputer system for mapping tissue sections with the light microscope, *J. Neurosci. Methods*, 25 (1988) 165-173.
- 2 Arendash, G.W. and Gorski, R.S., Enhancement of sexual behavior in female rats by neonatal transplantation of brain tissue from males, *Science*, 217 (1986) 1276-1278.
- 3 Bermúdez-Rattoni, F., Escobar, M.L., Piña, A.L., Tapia, R., López-García, J.C. and Hiriart, M., Effects of nerve growth factor

on the recovery of conditioned taste aversion in the insular cortex lesioned rats. In R.L. Doty and D. Müller-Schwarze (Eds.), *Chemical Signals in Vertebrate*, VI, Plenum, New York, pp. 297-303, 1992.

- 4 Brackett, N.L. and Edwards, D.A., Medial preoptic connections with the midbrain tegmentum are essential for male sexual behavior, *Physiol. Behav.*, 32 (1984) 79-84.
- 5 Caggiula, A.R., Antelman, S.M. and Zigmond, M.S., Ineffectiveness of sexually arousing stimulation after hypothalamic lesions in the rat, *Physiol. Behav.*, 12 (1974) 313-316.
- 6 Fernández-Ruiz, J., Escobar, M.L., Piña, A.L., Díaz-Cintra, S., Cintra-McGlone, F.L. and Bermúdez-Rattoni, F., Time dependent recovery of taste aversion learning by fetal brain transplants in gustatory neocortex lesioned rats, *Behav. Neural. Biol.*, 55 (1991) 179-193.
- 7 Ginton, A. and Merari, A., Long range effects of MPOA lesion on mating behavior in the male rat, *Brain Res.*, 120 (1977) 158-163.
- 8 Hansen, S., Kohler, Ch., Goldstein, M. and Steinbusch, H.V., Effects of ibotenic acid-induced neuronal degeneration in the medial preoptic area and the lateral hypothalamic area on sexual behavior in the male rat, *Brain Res.*, 239 (1982) 213-232.
- 9 Heimer, L. and Larsson, K., Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic-anterior hypothalamic continuum, *Brain Res.*, (1966/1967) 248-263.
- 10 Huang, H.H., Kissane, J.Q. and Hawlylewicz, E.J., Restoration of sexual function and fertility by fetal hypothalamic transplant in impotent aged male rats, *Neurobiol. Aging*, 8 (1987) 465-472.
- 11 Kriger, D.T., Gibson, M.J., Zimmerman, E.A., Ferin, M., Charlton, H.M., Silverman, A.J. and Perlow, M.J., Correction of genetic gonadotropin-releasing hormone deficiency by grafts of fetal preoptic area tissue. In A. Bjorklund and U. Stenevi (Eds.), *Neural Grafting in The Mammalian CNS*, Elsevier, New York, 1985, pp. 645-653.
- 12 Larsson, K., Non-specific stimulation and sexual behavior in the male rat, *Behaviour*, 20 (1963) 110-114.
- 13 Luine, V.N., Renner, K.J., Frankfurt, M. and Azmitia, E., Facilitated sexual behavior reversed and serotonin restored by raphe nuclei transplanted into denervated hypothalamus, *Science*, 226 (1984) 1436-1438.
- 14 Paxinos, G. and Watson, C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Orlando, 1986.
- 15 Paredes, R.G., Piña, A.L., Fernández-Ruiz, J. and Bermúdez-Rattoni, F., Fetal brain transplants induce recovery of male sexual behavior in medial preoptic area lesioned rats, *Brain Res.*, 523 (1990) 331-336.
- 16 Rodríguez-Sierra, J., Naggar, A. and Komisaruk, B., Monoaminergic mediation of masculine and feminine copulatory behavior in female rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 5 (1976) 457-463.
- 17 Rogers, J., Hoffman, G.E., Zorenzer, S.F. and Vale, W.W., Hypothalamic grafts and neuroendocrine cascade theories of aging. In J.R. Sladek, Jr. and D.M. Gash (Eds.), *Neural Transplants: Development and Function*, Plenum, New York, 1984, pp. 205-222.
- 18 Sodersten, P., Mounting behavior in the female rat during the estrous cycle, after ovariectomy, and after estrogen or testosterone administration, *Horm. Behav.*, 3 (1972) 307-320.
- 19 Sodersten, P., Increased mounting behavior in the female rat following a single neonatal injection of testosterone propionate, *Horm. Behav.*, 4 (1973) 1-17.

## El rol de la hipófisis en la conducta sexual de los machos de *Rattus norvegicus*

Los machos de *Rattus norvegicus* castrados por el método de Mittermeier demostraron que los transplantados de tejido hipófisiario inducían y mantenían una conducta sexual que requiere de participación de los testículos.

Los trasplantes de hipófisis extraídas de machos intactos, se detectó reactividad por conductas sexuales cuando se injertó la hipófisis dentro del transplante. Además, se detectaron grupos de células de hipófisis dentro del transplante, así como en los bordes del transplante y el tejido huésped. Estos resultados sugieren claramente que la hipófisis ejerce un papel facilitador sobre la conducta sexual (Vamber et al., 1991).

Tanto los trasplantes hipofisarios como los trasplantes localizados en medio del arco pituitario medio (APM), fueron capaces de inducir conducta sexual. Ninguno de los ratones que recibieron trasplantes heterotópicos (correas frontales) recuperaron la conducta. El análisis histológico de cinco animales mostró trasplantes saludables y bien integrados que en algunos casos parecían crecer más que los de hipófisis. Estos resultados sugieren que es necesaria la cohesión del tejido a transplante, para que se dé la recuperación funcional en los animales con lesiones del APM. Más aún, el hecho de que con trasplantes hipofisarios unilaterales o fuera del APM no se mostrara recuperación de la conducta sexual indica que los factores humorales o tróficos no son suficientes para inducir la recuperación conductual. Es posible que

... de la región... el tiempo para la... en el... las conexiones... la... así... parece... Por otro lado, en los... con... con... que las... para que... y una... (Escobar et al., 1989; Victorin, 1992; Deazuta et al., 1983).

Se han desarrollado varios modelos de trasplantes para estudiar tanto la recuperación de funciones como los mecanismos involucrados en el control de diferentes aspectos de la conducta sexual masculina en hombres, puede lograrse por diferentes tratamientos hormonales (Geddeson, 1992; 1978) y farmacológicos (Rodríguez-Ojeda et al., 1976) además de por trasplantes hipotálamicos (Arendash y Clark, 1982). Puede suponerse entonces, que en algunos modelos la recuperación de funciones reproductivas se asocia con factores lumbrales. Las lesiones del AFM representan un modelo donde no existe recuperación espontánea y en el que la conectividad entre el tejido transplantado y el huésped parece necesaria para la recuperación funcional.



## CONCLUSIONES GENERALES

## CONCLUSIONES GENERALES

Tradicionalmente se había considerado que la capacidad regenerativa del sistema nervioso de los mamíferos era nula a diferencia de la encontrada en aves y anfibios (Cowan et al., 1965). Hoy en día se sabe que el sistema nervioso central (SNC) es capaz de generar procesos que promueven la recuperación de funciones después de haber sido dañado. Sin embargo en casos de daño severo, es necesario intervenir con otros recursos los procesos naturales para promover la recuperación. Uno de estos recursos lo constituyen los trasplantes de tejido nervioso fetal, los cuales han probado tener éxito al mediar la recuperación de gran diversidad de conductas (Bjorklund y Stenevi, 1984; Fisher y Gage, 1993).

Recientemente la técnica de trasplantes de tejido cerebral fetal, ha sido empleada como una herramienta efectiva para disminuir las deficiencias funcionales y conductuales producidas por lesiones mecánicas o químicas (Kesslak et al., 1986; Isacson et al., 1986; Wictorin, 1992). Sin embargo la interrogante acerca de como actúan los trasplantes para promover la recuperación funcional permanece aun sin resolver.

Son varios los posibles mecanismos propuestos mediante los cuales los implantes pudieran estimular la recuperación funcional. Por ejemplo los implantes pueden restablecer las proyecciones interrumpidas tras una lesión o incrementar la disponibilidad de un neurotransmisor para facilitar la comunicación neuronal. Por otra parte los trasplantes pueden estimular la vascularización, eliminar sustancias tóxicas o promover la sobrevivencia y el crecimiento neuronales a través de interacciones tróficas entre el hospedero y el trasplante. (Cotman y Kesslak, 1988).

Un requisito importante para la credibilidad y éxito en los estudios sobre trasplantes intracerebrales es el uso de un modelo animal bien definido, de daño cerebral con la consecuente demostración de reconstitución funcional. Como ya hemos mostrado a lo largo de esta tesis, en nuestro laboratorio hemos trabajado con tres modelos diferentes. Cada uno de ellos nos ha dado información importante no sólo en referencia a la plasticidad nerviosa sino también sobre la función que cada estructura desempeña en el SNC. Recapitulando:

ESTRIADO. Las lesiones mecánicas y químicas del estriado dorsal probaron ser productoras del deterioro en la adquisición del condicionamiento de prevención pasiva (y de otros tipos de tareas como el laberinto de agua de Morris). Este impedimento pudo ser revertido por trasplantes de estriado fetal, mas no por trasplantes heterotópicos de mesencéfalo ventral o de corteza frontal fetales (trabajo II). La recuperación mediada por trasplantes estriatales pudo ser observada desde los quince días posteriores a la aplicación del trasplante (trabajo III). Asimismo, al aplicar implantes de gelfoam embebidos en FCN pudo observarse la reversión del efecto de las lesiones al ser probados los sujetos, también 15 días posteriores al implante (trabajo IV). El análisis histológico ha mostrado que tanto los trasplantes homotópicos como heterotópicos se integraron de manera adecuada al tejido huésped. Sin embargo existieron diferencias en cuanto a su crecimiento y tinción específica para la histoquímica de colinesterasa o la inmunocitoquímica para la enzima tirosina hidroxilasa, los implantes estriatales muestran claramente una organización particular de células positivas a la colinesterasa, con un reducido número de fibras inmunopositivas para tirosina hidroxilasa, mientras que los trasplantes de

mesencéfalo ventral (los de menor crecimiento) o los trasplantes de corteza (los de mayor crecimiento) no mostraron la tinción para la colinesterasa, ni con la misma intensidad ni con la organización histológica de los trasplantes estriatales; en cambio los trasplantes de mesencéfalo mostraron inmunotinción positiva a tirosina hidroxilasa en fibras y somas. Estos resultados se ven confirmados en trasplantes tanto con 15 como con 60 días de maduración (algunos datos no mostrados en esta tesis). El análisis histológico preliminar de los cerebros de ratas con implantes de gelfoam embebidos con FCN mostró que la tinción para colinesterasa, disminuída en aquellos sujetos con lesiones con NMDA, recupera intensidad al administrar el FCN mas no con DMEM. Por otro lado el análisis bioquímico indica que los trasplantes estriatales poseen niveles de actividad de colina acetiltransferasa similares a los controles, en contraste con los tejidos transplantados de mesencéfalo ventral. Los niveles de dopamina o de actividad de GAD mostraron ser parecidos en los trasplantes tanto heterotópicos como en los homotópicos. En el caso de los implantes con FCN, los datos preliminares indican que el tejido estriatal posee actividad de la colina acetiltransferasa similar a la encontrada en el grupo de controles intactos. Todas estas evidencias sugieren la participación del FCN y de la acetilcolina en la recuperación de la prevención pasiva en ratas con lesiones estriatales.

**CORTEZA INSULAR.** Las lesiones tanto electrolíticas como químicas de la corteza insular producen un impedimento en la adquisición del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS). No existe recuperación espontánea de estas lesiones. Los trasplantes de corteza insular revierten este impedimento y los efectos pueden observarse desde los 45 días de maduración del trasplante. Este fenómeno de recuperación conductual se ve acompañado por una maduración histológica bien clara, que se hace evidente en los estudios

con la técnica de Golgi y de conectividad con peroxidasa de rábano en transplantes homotópicos en distintas etapas de crecimiento (15, 30, 45 y 60 días). Asimismo, con la técnica histoquímica para colinesterasa se observó un aumento temporal en el número de células colinérgicas dentro de estos transplantes. Cuando se combina el tejido de corteza insular con FCN se observa una aceleración en el proceso de recuperación conductual, ya que desde los quince días post-implante se revierte el impedimento conductual. Sin embargo, al transplantar tejido heterotópico (de mesencéfalo), no es posible observar la misma respuesta de recuperación. La aplicación de FCN sólo no produjo ninguna recuperación. El análisis bioquímico ha mostrado que la actividad de colina acetiltransferasa de los transplantes homotópicos en combinación con el FCN es similar a los controles intactos. Estos resultados indican que si bien el FCN acelera la respuesta de recuperación, el tejido homotópico fetal juega un papel primordial en la respuesta de recuperación del CAS en ratas lesionadas en la corteza insular.

**HIPOTALAMO:** Las lesiones electrolíticas del Area Preóptica Media (APM) del hipotálamo eliminan la conducta sexual masculina en forma irreversible. Los transplantes de tejido hipotalámico fetal recuperaron la conducta sexual en forma paulatina. En tanto que los sujetos que recibieron transplantes heterotópicos (corteza fetal) no recuperaron la conducta. El análisis histológico reveló que ambos tipos de transplantes se integraron adecuadamente al tejido huésped (entiéndase por buena integración que el tejido transplantado puede establecerse y crecer dentro del huésped). Inclusive los transplantes de corteza en ocasiones ocuparon mayor volumen que los tejidos homotópicos. Sin embargo, por estudios con el trazador retrógrado fluorogold se observó que los transplantes hipotalámicos pero no los de corteza cerebral, establecieron

conexiones con el tegmento dorsolateral, conexiones que se sabe son importantes para la expresión de patrón copulatorio. Estos resultados sugieren que las conexiones entre el tejido transplantado y el huésped son necesarias para la recuperación conductual en animales con lesiones en el APM.

Como podemos observar nuestros modelos tienen varios aspectos en común, los cuales nos hablan sobre todo del comportamiento heterogéneo de los trasplantes y de su posible modo de acción. Asimismo, las diferencias muestran sobre todo la fisiología del área en la que se está aplicando el trasplante. A continuación se discuten algunos de estos puntos.

Las lesiones cerebrales producidas artificialmente han sido utilizadas por muchas décadas por los neurocientíficos del comportamiento interesados en definir el papel funcional de regiones discretas del cerebro y estudiar los procesos responsables de la recuperación gradual que típicamente sigue a las lesiones. Cuando Perlow y Freed (1979) demostraron que las ratas sujetas a lesiones estriatales podían reinstalar la función motora normal después del trasplante de neuronas fetales dopaminérgicas, creció el interés en el uso de lesiones cerebrales para el estudio de las consecuencias funcionales de los trasplantes cerebrales. Ahora parece que existen muchas deficiencias conductuales que pueden ser reducidas o revertidas por trasplantes de tejido nervioso fetal en el cerebro dañado y/o en ratas viejas (Bartus, 1987; Gash et al., 1985; Dunnett, 1990, 1991). Sin embargo algunos grupos controles son rara vez incluidos para demostrar conclusivamente que factor(es) pueden ser responsables de dicha recuperación. Por ejemplo, muchas deficiencias conductuales que siguen a lesiones cerebrales discretas, se conoce que pueden tener una recuperación espontánea: algunas veces es difícil de saber con

certeza si las observaciones de recuperación funcional es simple o aún primariamente el resultado de la acción del tejido cerebral transplantado (Labbe et al., 1983). En este sentido, en nuestros tres modelos, sabemos que los efectos de las lesiones que producimos en cualquiera de las tres zonas cerebrales (estriado dorsal, corteza insular o APM del hipotálamo) o por cualquiera de los métodos de lesión (electrolítica o química) no son revertidos espontáneamente. Debo aclarar aquí que las lesiones que producimos deben cubrir ampliamente el área respectiva, pues de lo contrario no observamos pérdida de la conducta que estamos midiendo.

La recuperación funcional promovida por los trasplantes neuronales, debe estar influenciada por el papel que juega la región cerebral dañada en la conducta específica que se está midiendo. Así, si una región cuyo papel en una conducta es compartida por otras regiones, tendrá mayor posibilidad de que en cuanto sea dañada, las otras regiones con las cuales comparte la regulación de la conducta, puedan reemplazarla o sustituirla. Este mecanismo de plasticidad, bien pudiera ser favorecido por la presencia de un implante neural. En cambio, si un área del cerebro juega un papel central y definitivo en una conducta dada, la recuperación conductual bien pudiera necesitar de un proceso cuya temporalidad es mayor a la del primer caso. En cuanto a la recuperación conductual que observamos en nuestros modelos, es de resaltar el hecho de que tanto en el caso de la corteza insular como en el caso de hipotálamo la recuperación es gradual y esto correlaciona con la madurez del trasplante y la reinnervación que aparentemente se tiene que llevar a cabo. En tanto que en el estriado la recuperación es temprana y se relaciona con un evento químico (tráfico específicamente).

En todos nuestros estudios, la recuperación funcional siempre fue mediada por trasplantes homotópicos y no así por trasplantes heterotópicos. Al respecto, existen una gran variedad de reportes que indican que existe especificidad del tejido transplantado, tanto para la recuperación funcional, como para la buena integración del propio implante en el tejido huésped (Stein et al., 1985; Nilsson et al., 1987; Heusching et al, 1988). Por ejemplo, Heusching y sus colaboradores (1988), efectuaron un estudio en el que fue probada la actividad trófica de diferentes regiones del SNC (cortical, hipocampal, septal y estriatal) sobre neuronas embrionarias transplantadas, provenientes de diferentes áreas cerebrales, encontrando que mientras los trasplantes de corteza e hipocampo se integraron y crecieron adecuadamente en las cuatro regiones, los trasplantes de septum, se atrofiaron al ser colocados en la región estriatal. Los autores destacan el hecho de que en todos los casos los trasplantes homotópicos, mostraron una mejor integración caracterizada por un número elevado y constante de neuronas sobrevivientes. Así Heusching y sus colaboradores, sostienen que cualquier área del cerebro adulto lesionada, presenta actividad trófica específica, preponderantemente dirigida hacia las células homotópicas embrionarias correspondientes. La habilidad para responder a la mencionada actividad, parece cambiar con el grado de afinidad entre el trasplante y la zona receptora del hospedero.

Desde el punto de vista histológico, tanto los trasplantes homotópicos como los trasplantes heterotópicos pudieron integrarse adecuadamente al tejido huésped. Inclusive en el caso del estriado y del hipotálamo los trasplantes corticales crecieron más que los trasplantes homotópicos correspondientes, aunque en ambos casos probaron ser no promotores de recuperación funcional. Este crecimiento podría estar asociado al hecho de que



la corteza es una estructura filogenéticamente más reciente y por lo tanto tiene mayor capacidad plástica para su crecimiento, y/o que la corteza aun se encuentra en crecimiento (etapa en donde la mitosis aún es posible) al ser transplantada al tejido huésped.

Al analizar las tinciones histoquímicas en los tres modelos, observamos que la organización interna de los implantes estriatales es característica de lo ya reportado por el grupo de Gaybriel (Liu et al., 1992; Graybiel et al., 1987, 1989), y fue el único tipo de trasplante en donde se pudo observar una organización conspicua. Los trasplantes estriatales fetales desarrollan una organización modular en donde agrupaciones de células enriquecidas por muchos neurotransmisores característicos de estriado (regiones P), están embebidas o rodeadas por regiones que expresan únicamente bajos niveles de estas sustancias (regiones NP). Al respecto nos sorprenden varias interrogantes: Cómo es posible que una estructura como el estriado, que aparenta jugar un papel de donador trófico, puede desarrollar tal organización citoarquitectónica, mientras que la corteza insular o el hipotálamo, en donde la reconstrucción de circuitería aparentemente es esencial, no poseen organización interna aparente? (aunque al respecto hay que estudiar más detenidamente dichos trasplantes). Es posible que el proceso de restablecimiento de circuitería sacrifique al procesamiento de organización interna de los trasplantes corticales e hipotalámicos?

Aunque muchos investigadores interpretan la recuperación observada en términos de "reinervación funcional" promovida por el trasplante (de hecho, esta posibilidad continúa representando un objetivo importante en esta área de investigación), la probabilidad de que los trasplantes sirvan como sistemas de liberación química (de neurotransmisores, hormonas o factores tróficos) es muy

amplia. Dado que una de las funciones primarias del tejido neural es secretar neuroquímicos, de acuerdo con cambios en su condición homeostática, y que el tejido neural transplantado continúa expresando esta respuesta inherente y fenotípica, parece claro que un resultado inmediato al transplantar tejido nervioso, involucra una descarga de sustancias de naturaleza diversa en las áreas circundantes al implante. Así el mayor problema que permanece es si el tejido transplantado hace algo más que ser un sistema de liberación de sustancias. Pero esto es por demás una pregunta muy difícil de contestar. Muchos estudios han utilizado diversas conductas como punto crucial y final de la investigación, y aunque el mejoramiento de la conducta es una condición importante y frecuentemente necesaria para demostrar recuperación funcional, no define adecuadamente la naturaleza del mecanismo responsable de la recuperación. En este respecto es notable que algunos de los cambios conductuales más impresionantes reportados para los trasplantes neuronales, han sido obtenidos también, en otros estudios, con administraciones parenterales de drogas con mecanismos de acción apropiados (Bartus, 1987). De manera similar, se han reportado varios ejemplos de recuperación funcional significativa después del trasplante de tejidos no neuronales, con células cromafines o astrocitos (Freed, 1981; Lindsay et al, 1987; Smith et al., 1987). En otros estudios la recuperación funcional se hace evidente al realizar la infusión de diversas sustancias por medio de bombas Alzet (Perlow y Freed, 1979; Will y Hefti, 1985). Colectivamente, estos reportes son el argumento de que la recuperación funcional promovida por los trasplantes no necesariamente está relacionada con la reinervación funcional del cerebro dañado.

A este respecto nuestros estudios en el estriado sugieren que el mecanismo probable de recuperación promovida por los trasplantes estriatales

y por los implantes con FCN, es claramente es de tipo químico. Si bien se hacen necesarios experimentos encaminados a caracterizar el papel trófico que desempeñan los tejidos fetales estriatales, queda claro que en este modelo la recuperación funcional no está directamente relacionada con la reestructuración de la circuitería neuronal. Por otro lado en el caso de los transplantes corticales la función del tejido neural transplantado no queda bien claro. El FCN juega aquí un papel de acelerador de la reinstalación funcional, pero por si sólo no es promotor de recuperación, por lo que queda por resolver el papel del tejido fetal transplantado. Actualmente en nuestro laboratorio, estamos llevando a cabo experimentos encaminados a probar el papel del FCN en estos dos modelos utilizando anticuerpos contra el factor trófico. Resultados preliminares indican que por lo menos a los quince días es posible bloquear la recuperación del CAS implantando en la corteza insular, tejido homotópico, gelfoam, embebido en FCN y administrando posteriormente anticuerpos anti-FCN. Sin embargo habrá que probar el bloqueo de la función trófica del tejido transplantado (corteza insular) en tiempos de recuperación más largos (45 días) cuando conocemos que ya esta ejerciendo su efecto promotor de recuperación.

Para el caso de los transplantes hipotalámicos, la recuperación se nos presenta relacionada con la reinervación promovida por los transplantes neurales. Sin embargo, se requiere de investigación adicional con estudios a nivel electrofisiológico y neuroquímico para establecer que la reinnervación es completa y realmente funcional.

En este contexto enelque los transplantes de tejido cerebral fetal son capaces de integrarse al tejido hospedero, de establecer funciones e incluso incrementar su sobrevivencia y aún acelerar la recuperación si son combinados

con algunos factores tróficos, es necesario señalar que algunas investigaciones en las que se han analizado los efectos a largo plazo tanto de la administración de factores tróficos como de los trasplantes o una combinación de ambos, han mostrado efectos negativos sobre las manifestaciones conductuales (Will y Hefti, 1985; Hefti, 1990; Buzsaki et al, 1987). La hipótesis más ampliamente documentada que intenta explicar este fenómeno, afirma que después de largos períodos de desarrollo post-trasplante se establecen conexiones inadecuadas entre el trasplante y el huésped al tiempo que se origina una invasión de los tejidos adyacentes al implante, con el consecuente trastorno de la comunicación neuronal (Milner y Loy, 1980; Gage et al., 1984; Will y Hefti, 1985; Escobar, 1993).

Aunque no todos los estudios demuestran claramente que el tejido cerebral transplantado es responsable de la recuperación funcional, existen muchos ejemplos en los que se demuestra que el tejido implantado juega un papel importante en el mejoramiento de la función. Aún en estos casos, sin embargo, es difícil determinar el mecanismo específico responsable, excepto, quizás en aquellos casos en donde el trasplante es utilizado como un puente a través de una pequeña lesión (Reier et al., 1988). Cada mecanismo puede variar en extensión y varios mecanismos pueden operar para influenciar la capacidad funcional de cualquiera de los sujetos experimentales. Entonces, más que identificar cual es el mecanismo general de la función del implante, es necesario considerar cada modelo individual (las interacciones entre la lesión experimental, el tejido implantado, el ambiente del huésped y la función que se esté probando), para entender cabalmente cómo los trasplantes ejercen sus efectos funcionales.

A la luz de los conocimientos hasta ahora adquiridos se hace mas claro que el SNC posee una plasticidad enorme. No hay respuestas simples de cómo el mismo SNC utiliza esta plasticidad para que ocurra la recuperación funcional después de que el cerebro ha sido dañado. El uso de la técnica de transplantes de tejido nervioso para promover recuperación ha constituido una herramienta valiosa para el estudio de la recuperación funcional, y por supuesto de los mecanismos que subyacen a ella, esto es, a la plasticidad neuronal.

Por los estudios revisados en esta tesis, se muestra que la especificidad de la reconectividad neuronal entre el transplante y el tejido huésped no es necesariamente una condición para la recuperación funcional (trabajos II, III, IV). Sin embargo, existen circunstancias en las cuales la circuitería específica promovida por los implantes de tejido neural, puede ser esencial para que ocurra dicha recuperación (trabajos VII y VIII) o en algunos casos (trabajos V y VI) en los que la circuitería es importante en estadios avanzados pero que en las etapas tempranas de recuperación son determinantes otros factores, como son los tróficos o los neurotransmisores.

Hoy en día, se nos presentan interrogantes cada vez más profundas acerca de los mecanismos por los cuales los implantes de tejido neural ejercen su acción sobre el cerebro adulto. Desentrañar los maravillosos secretos que nos guarda el SNC en su funcionamiento y su capacidad de recuperación, ya sea, por medio de la plasticidad intrínseca al sistema o con la ayuda de herramientas neuronales, como son los transplantes, es la tarea a la cual avocarnos en el futuro constituirá una exploración por demás fascinante.

## REFERENCIAS

- Arendash G.W., Gorski R.S. (1982). *Science*, 217: 1276-1278.
- Bassant M.H., Jolt M., Nilsson O.G., Bjorklund A., Lamour Y. (1988). *Brain Res.* 460: 8-16
- Bartus R.T. (1987). Neural tissue transplantation. Comments on its role in general neuroscience and its potential as a therapeutic approach. En: Cell and tissue transplantation into the adult brain. Azmitia E.C., Bjorklund A. Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 495: 355-362
- Bermúdez-Rattoni F., Mújica-González M., Prado-Alcalá R.A. (1986). *Pharmac. Biochem. and Behav.* 24: 715-719.
- Bermúdez-Rattoni F., Fernández J., Sanchez M., Aguilar-Roblero R., Drucker-Colín R. (1987). *Brain Res.*, 416:147-150.
- Bermúdez-Rattoni F., Rusiniak K.W., García J. (1983). *Behav. Neur. Biol.* 37: 61-75.
- Bjorklund A. (1991). *TINS* 14 (8): 319-322.
- Bjorklund A., Segal M., Stenevi U. (1979). *Brain Research*, 170: 409-426.
- Bjorklund A., Stenevi U. (1977). *Cell tissue reserch*, 185:289-302.
- Bjorklund A., Stenevi U. (1984). *Ann. Rev. Neurosci.* 7:279-308.
- Bjorklund A., Stenevi U. (1985). *Neural grafting in the mammalian CNS.* Elsevier, Amsterdam.
- Brackett N.L., Edwards D.A. (1984). *Physiol. Behav.* 32: 79-84.
- Buzsaki G., Czopf J., Kondakor I., Bjorklund A., Gage F.H. (1987). *Neuroscience*, 22: 871-883.
- Buzsaki G., Freund T., Bjorklund A., Gage F.H. (1988). Restoration and deterioration of function by brain grafts in the septohippocampal system. En Gash D., Sladek J. (Eds.), *Transplantation into the mammalian CNS.* Progress in Brain Research, 78.
- Buzsaki G., Gage F.H., Czopf J., Bjorklund A. (1987). *Brain Research* 400: 334-347.
- Buzsaki G., Gage F.H., Kellenyi H., Bjorklund A. (1987). *Brain Research*, 400: 321-333.

Cassel J.C., Kelche, M., Majchrzak M., Will B.E. (1992). *Rest. Neurol. and Neurosci.* 4: 65-96.

Chang F.L.F., Greenough W.T. (1984). *Brain Res.* 309, 35-46.

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

Coyle J.T., Price D.L., DeLong M. (1983). *219:1184-1190.*

Cowan W.M., Raisman G., Powell T.P.S. (1965). *J. Neurol. Neurosurg. Psychi.*, 28: 137-151.

Cuello A.C., Maysinger D., Garofalo L. (1992). *Molec. Neurobiol.* 6: 451-461.

Daniloff J.K., Bodony R.P., Low W.C., Wells J. (1985). *Brain Research*, 346: 176-180.

Davis G.E., Blaker S.N., Engvall E., Varon S., Manthorpe M., Gage F.H. (1987). *Science*, 236:1106-1109.

Daszuta A., Strecker R.E., Brundin P., Bjorklund A. (1988). *Brain Res.* 458:1-19

Dekker A.J., Gage F.H., Thal L.J. (1992). *Neuroscience* 48: 111-119

Dekker S.B., McGaugh J.L. (1991). *Synapse* (1991) 7, 151-168.

Dekker A.J., Thal L.J. (1993). *Brain Res.* 601: 329-332.

Desmond N., Levy W.B. (1983). *Brain Res.* 265, 21-31.

Dunnett S.B. (1990). *Eur. J. Neurosci.* Vol.2: 567-587.

Dunnett S.B. (1991). *TINS* Vol.14 (8):371-376.

Dunnett S.B., Bjorklund A. (1987). *J. Exp. Biol.* 132:265-289.

Dunnett S.B., Richards S.J. (1990). Neural transplantation. From Molecular Basis to clinical applications. *Progress in Brain Research.* Vol. 82. Elsevier. Amsterdam.

Dunnett S.B., Toniolo G., Fine A., Ryan C.N., Bjorklund A. (1985). *Neurosci.* 16:7877-797.

Dunnett S.B., Bjorklund A., Schmidt R.H., Stenevi U., Iversen S.D (1983). *Acta Physiol. Scand.* (suppl.) 522: 39-47.

## REFERENCIAS

- Arendash G.W., Gorski R.S. (1982). *Science*, 217: 1276-1278.
- Bassant M.H., Jolt M., Nilsson O.G., Bjorklund A., Lamour Y. (1988). *Brain Res.* 460: 8-16
- Bartus R.T. (1987). Neural tissue transplantation. Comments on its role in general neuroscience and its potential as a therapeutic approach. En: Cell and tissue transplantation into the adult brain. Azmitia E.C., Bjorklund A. Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 495: 355-362
- Bermúdez-Rattoni F., Mújica-González M., Prado-Alcalá R.A. (1986). *Pharmac. Biochem. and Behav.* 24: 715-719.
- Bermúdez-Rattoni F., Fernández J., Sanchez M., Aguilar-Roblero R., Drucker-Colín R. (1987). *Brain Res.*, 416:147-150.
- Bermúdez-Rattoni F., Rusiniak K.W., García J. (1983). *Behav. Neur. Biol.* 37: 61-75.
- Bjorklund A. (1991). *TINS* 14 (8): 319-322.
- Bjorklund A., Segal M., Stenevi U. (1979). *Brain Research*, 170: 409-426.
- Bjorklund A., Stenevi U. (1977). *Cell tissue reserch*, 185:289-302.
- Bjorklund A., Stenevi U. (1984). *Ann. Rev. Neurosci.* 7:279-308.
- Bjorklund A., Stenevi U. (1985). *Neural grafting in the mammalian CNS*. Elsevier, Amsterdam.
- Brackett N.L., Edwards D.A. (1984). *Physiol. Behav.* 32: 79-84.
- Buzsaki G., Czopf J., Kondakor I., Bjorklund A., Gage F.H. (1987). *Neuroscience*, 22: 871-883.
- Buzsaki G., Freund T., Bjorklund A., Gage F.H. (1988). Restoration and deterioration of function by brain grafts in the septohippocampal system. En Gash D., Sladek J. (Eds.), *Transplantation into the mammalian CNS*. Progress in Brain Research, 78.
- Buzsaki G., Gage F.H., Czopf J., Bjorklund A. (1987). *Brain Research* 400: 334-347.
- Buzsaki G., Gage F.H., Kellenyi H., Bjorklund A. (1987). *Brain Research*, 400: 321-333.



Escobar M.L.(1993). Efectos del factor de crecimiento neuronal sobre la recuperación conductual mediada por transplantes neocorticales. Tesis de Doctorado. UACPyP-CCH. UNAM.

Escobar M.L., Fernández J., Guevara-Aguilar R., Bermúdez-Rattoni F. (1989). *Brain Res.* 478: 368-374.

Fisher L.J., Gage F.H. (1993). *Physiol. Rev.* Vol.73 (3): 583-616.

Freed W.J. (1986). 153-156.

Freed W.J., Medinaceli L., Wyatt R.J. (1985). *Science* 227: 1544-1552.

Freed W.J., Morihisa J.M., Spoor E., Hoffer B.J., Olson L., Seiger A., Wyatt R.J. (1981). *Nature (Lond.)* 292:351-352.

Freund T.F., Bolam J.P., Bjorklund A., Dunnett S.B., Smith A.D. (1985). Synaptic connections of grafted dopaminergic neurons that reinnervate the neostriatum: A tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. En: A. Bjorklund y U Stenevi (Eds), *Neural grafting in the mammalian CNS* Amsterdam, Elsevier. 529-537.

Frimm D.M., Short M.P., Rosenberg W.S., Simpson J., Breakfield X.O., Isacson O. (1993). *J. Neurosurgery*, 78:267-273.

Gage F.H., Bjorklund A., Stenevi U. (1984). *Nature*, 308: 637-639.

Gage F.H., Victorin K., Fisher W., Williams L.R., Varon S., Bjorklund A. (1986). 19: 241-255.

Gash D.M., Collier T.J., Sladek J.R. (1985). *Neurobiol. aging* 6: 131-150.

Gash D.M., Sladek J.R. (1988). *Transplantation into the mammalian CNS. Progress in Brain Research.* Vol. 76. Elsevier Amsterdam.

Gibson M.J., Krieger D.T. (1985). *TINS* 40:331-334.

Goldberg J.I., Kater S.B. (1985). *Soc. Neurosci. Abstr.* 11: 158.

Graybiel A.M., Dunnett S.B., Baughman R.W., Liu F.C. (1987). *Neurosci. (Suppl)*. 22:S265.

Graybiel A.M., Liu F.C., Dunnett S.B. (1989). *J. Neurosci.* 9: 3250-3271.

Hagg T., Vahlsing H.L., Manthorpe M., Varon S. (1990) *J. Neurosci.* 10, 3087-3092.

Hefti F. (1986). *J. Neurosci.* 6:2155-2162.

Hefti F.(1990). Science, 247: 408-410.

Haydon P.G., McCobb D.P., Kater S.B. (1984) Science 226, 561-564.

Heuschling P., Paermentier F., Bosh de Aguilar P. (1988). Dev. Brain. Res. 38:9-17

Isacson O., Brundin P., Kelly P.A.T., Gage F.H., Bjorklund A. (1984). Nature 311: 458-460.

Isacson O., Dunnett S.B., Bjorklund A. (1986). PNAS 83: 2728-2732.

Jinnah, H.A., Fisher J.L., Wolff J.A., Xu L., Langlais P.J., Iuvone P.M., O'Malley, Rosenberg M.B. "Grafting fibroblast genetically modified to produce L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease" Restorative Neurology and Neuroscience (Elsevier, Cambridge, 1989).

Kesslak J.P., Brown L., Steichen C., Cotman C.W. (1986). Exp. Neurol. 94: 615-656.

Kimble D.P. (1990). Psychological Bulletin Vol. 108, No. 3: 462-479.

Koide K., Hashitani T., Aihara N., Mabe H., Nishino H. (1993). Rest. Neur. and Neurosci. 5:205-214.

Kromer L.F., Bjorklund A., Stenevi U.(1981) Brain Research, 210: 173-200.

Kromer L.F., Cornbrooks C.J. (1985). PNAS 82:6330-6334.

Labbe R.A., Firl A., Mufson E.J., Stein D.G. (1983). Science 221: 470-472.

Lapchack P.A., Hefti F. (1991). 42:639-649.

Le Gros Clark W.E. (1942). J. Anat. 77: 20-48.

Lindsay R.M., Emmett C., Raisman G., Seeley P.J. (1987). Ann. N.Y. Acad Sci. Vol. 495: 35-52

Liu F.C., Dunnett S.B., Graybiel A.M. (1992). J. Neurosci. 12(11): 4281-4297.

Lois C., Alvarez-Buylla A. (1993). PNAS 90 (5):2074-2077.

López-García J.C., Fernández-Ruiz J., Bermúdez-Rattoni F., R.Tapia. (1990). 523: 105-110.

Lugaro E. (1906). Riv. Path. Nerve. Mentale 11: 320-327

Maragos W.F., Greenamyre J.T., Penney J.B., Young A.B. (1987) TINS 10:65-68.

- Mattson, M.P., Taylor-Hunter A., Kater S.B. (1988). *J. Neurosci.* 8: 1704-1711.
- Milner T.A., Loy R. (1980). *Brain Res.* 197: 391-399.
- Nathaniel E.J.H., Clemente C.D. (1959). *Exp. Neurol.* 1: 68-81, 1959.
- Nieto-Sampedro M., Cotman C.W. (1986). Growth factor induction and temporal order in CNS repair. En *Synaptic plasticity and remodeling*. Ed. C.W Cotman. Gilford Press, New York. pp. 407-456.
- Nilsson O.G., Shapiro M.L., Gage F.H., Olton D.S. Bjorklund A. (1988). *J. Comp. Neurol.* 268: 204-222.
- Nothias F., Onteniente B., Geffard M., Peschanski M.(1988). *Brain Res.*, 463: 341-345.
- Olson L., Ayer-LeLievre C., Ebendal T., Eriksson-Nilsson M., Ernsford P., Henschen A., Hoffer B., Giacobini M., Mouton P., Palmer M., Persson H., Sara V., Stronberg I., Wetmore C. "Grafts, growth factors and grafts that make growth factors and grafts that make growth factors", *Progress in Brain Res.*, Vol. 82., S.B. Dunnett, S.J. Richards (Eds.) Elsevier, Amsterdam, 1990. pp.55-66.
- Perlow M.J., Freed W.J. (1979). *Science*, 204: 643-647.
- Perlow M.J., Freed W.J., Hoffer B.J., Seiger A., Olson L., Wyatt R.J., (1979). *Science*, 204: 643-647.
- Perry E.K.(1990). Nerve growth factor and the basal forebrain cholinergic system: a link in the etiopathology of neurodegenerative dementias? *Alzheimer's and associated disorders*. Vol.4 pp.1-13.
- Prado-Alcalá R.A. (1985). *Life Sciences*, 37: 2135-2142.
- Prado-Alcalá R.A. (1993).
- Prado-Alcalá R.A., Grinberg-Zylberbaum J., Alvarez-Leefmans J., Brust-Carmona H. (1973). *Phys. and Behav.* 12: 249-253.
- Prado-Alcalá R.A., Kaufmann P., Moscona R. (1980). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12: 249-253.
- Ranson S.W. (1914). *J. Comp. Neurol.* 24:547-558.
- Reier P.J., Houle J.D., Jakeman L., Winialski D., Tessler A. (1988). Transplantation of fetal spinal cord tissue into acute and chronic hemisection and contusion lesions of the adult spinal cord. En: *Transplantation into the mammalian CNS*. Gash D.M., Sladek J.R.(Eds). Elsevier, Amsterdam: 173-180.

Rodríguez-Sierra J., Naggar A., Komisaruk B. (1976). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5: 457-463.

Segal M., Stenevi U., Bjorklund A. (1981). *Neuroscience Letters*, 27:7-12.

Seil F.J. (1988). *Neural regeneration and transplantation. Frontiers in clinical Neuroscience. Vol. 6.* Liss. New York.

Smith G.M., Miller R.H., Silver J. (1987). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 495:185-206

Soderstein P. (1972). *Horm Behav.*, 3: 307-320.

Soderstein P. (1973). *Horm. Behav.*, 4: 1-17.

Stein D.G., Labbe R., Attella M.J., Rakowsky H.A. (1985). *Behav. Neural. Biol.* 44: 266-277.

Stronmberg I., Wetmore C.J., Ebendal P., Ernford H., Olson L. (1990) *J. Neurosci. Res.* 25: 405-411.

Tello F. (1911). *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid.* 9:123-159.

Tello F. (1911). *Rev. Clin. Madrid* 5:292-294.

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

Warner R.K., Thompson J.T., Markowski J.T., Loucks J.A., Bazzet T.J., Eaton R.C., Hull E.M. (1991). *Brain Res.* 540: 177-182.

Will B., Hefti F. (1985). *Behav. Brain Res.* 17: 17-24

Will B., Pallage V., Eclancher F. (1991). Nerve growth factor and behavioral recovery after brain damage in rats. En: *Growth factors and Alzheimer's disease.* Hefti F., Brachet P., Will B., Christen Y., Will B (Eds.). Springer, Heidelberg. pp. 117-130.

Winocur G. (1974). *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86: 432-439.

Wictorin K. (1992). *Progress in Neurobiology, Vol 38:* 611-639.

Wolf N.J., Butcher I. (1982). *Brain Res. Bull* 8: 752-763.

Wyers E.J., Peek H.V.S. Ellison J.S., Herz M.J. (1968). *Exp. Neurol.* 22:350-366.