

132
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA

EFFECTOS DE LOS IMPLANTES CEREBRALES SOBRE
LA EVOCACION DE RESPUESTAS CONDICIONADAS

T E S I S
Que para optar por el grado de
LICENCIADO EN PSICOLOGIA
PRESENTA

Christopher Edward Ormsby Jenkins

Director de Tesis.

Dr. Federico Bermúdez Rattoni

Director de la Facultad:

Dr. Juan José Sánchez Sosa



México, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE COPIA



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.

A tí, Tania, por lo que hemos sido y por lo que nos falta ser. Gracias por ser tú misma.

For you, mom and dad, for bringing me up and always being by my side. None of this would be possible without you.

A todos mis maestros que forjaron mi interés en la investigación, muy especialmente a Ana Eugenia Díaz de León, Jacobo Grinberg, Alfonso Salgado, Carlos Bruner, Raúl Avila y Francisco Pérez Cota.

A mis compañeros del Lab, los que están y los que estuvieron, Gracias por éstos años. En especial a Ana, por iniciarme en mis primeros pininos y a Víctor por soportar mis histerias.

A todos aquellos que directa o indirectamente me ayudaron a completar mi carrera y este trabajo.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo fué realizado en el laboratorio del Dr. Federico Bermúdez en el Instituto de Fisiología Celular. Le agradezco todos los recursos y la orientación que me proporcionó para la realización de éste trabajo.

Una gran parte del trabajo fué realizado en colaboración con Víctor Ramírez, por lo que le agradezco su valiosa ayuda.

Agradezco la participación de Oreste Carbajal por su asistencia técnica.

Esta tesis fué apoyada por una beca otorgada por medio del proyecto IN204689 de la DGAPA de la UNAM.

INDICE.

	Página
RESÚMEN	1.
INTRODUCCIÓN	2.
ANTECEDENTES	4.
Capítulo 1. Consideraciones Generales sobre la Neurofisiología de la Memoria	5.
Capítulo 2. El Condicionamiento Aversivo a los Sabores	12.
Capítulo 3. La Corteza Insular de la Rata	18.
Capítulo 4. Los Implantes de Tejido Cerebral	23.
Capítulo 5. El Factor de Crecimiento Neuronal	31.
Capítulo 6. La Corteza Insular en el Aprendizaje y la Memoria	36.
EXPERIMENTO 1	45.
Objetivo	46.
Sujetos	47.
Materiales	47.
Procedimiento	52.
Resultados	58.
Discusión	65.
EXPERIMENTO 2	68.
Objetivo	69.
Sujetos	69.
Materiales	70.
Procedimiento	71.
Resultados	78.
Discusión	84.
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	88.
REFERENCIAS	98.

RESUMEN

Dentro del estudio de la neurofisiología del aprendizaje y la memoria, ha sido ampliamente utilizado el modelo del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), probablemente debido al conocimiento de los principales sustratos anatómicos que le subyacen. Una estructura que parece ser fundamental en el proceso de adquisición de ésta conducta es la corteza insular (CI). Las lesiones de esta estructura previas al aprendizaje producen en ratas una incapacidad de ejecutar esta tarea. Similarmente, las lesiones inmediatamente después del aprendizaje también las incapacitan en su ejecución. Este efecto de las lesiones de la CI también se observa para la tarea de prevención pasiva (PP). Estos antecedentes indican que la CI está involucrada en la adquisición y en la consolidación de ambas tareas. En el primer experimento se propuso examinar la posibilidad de que la CI estuviera involucrada además en la retención y evocación de estas tareas, mediante la lesión dos días después de la adquisición, permitiendo así la consolidación antes de lesionar. Se observó que los animales lesionados tuvieron deficiencias en ambas tareas, comparado con un grupo control, lo que indica que esta estructura está involucrada en procesos de memoria a largo plazo (retención y evocación) para el CAS y la PP. Por otro lado se ha reportado que los déficits producidos por las lesiones de CI pueden ser revertidos con la implantación de tejido fetal cerebral suplementado con el péptido factor de crecimiento neuronal (FCN), a los quince días post-implante. El tejido fetal sin el suplemento, o el FCN solo, no inducen recuperación a este tiempo. Con el fin de observar los efectos de éstos implantes sobre las deficiencias en la memoria a largo plazo para el CAS, animales con lesiones de CI post-consolidación recibieron implantes de tejido fetal cerebral adicionado con FCN. Un segundo grupo recibió los implantes sin el factor, otro recibió solo el factor, y otro sirvió de control de lesión solo con inyección de vehículo. Los resultados mostraron que los animales que recibieron tanto implantes con el factor como sin él recuperaron la evocación (recuerdo) del condicionamiento al sabor adquirido previamente a la lesión, no así los grupos que recibieron solo el factor o el vehículo. Sin embargo, solo el grupo de implante con factor pudo aprender un nuevo CAS. Se concluye que la recuperación de la capacidad de evocar el CAS puede ser inducida mediante implantes de tejido fetal cerebral, y que esta recuperación es un proceso independiente de FCN. Asimismo, la CI es una estructura involucrada tanto en los procesos de adquisición como los de evocación del CAS y la PP. Se postulan dos posibles mecanismos por los cuales la corteza insular pueda estar involucrada en estos procesos.

INTRODUCCIÓN.

El objetivo del trabajo que se presenta a continuación es ampliar el conocimiento que actualmente se tiene de las bases neurofisiológicas del aprendizaje y la memoria, particularmente en el modelo de la participación que tiene la estructura cerebral conocida como corteza insular en diversos procedimientos de condicionamiento. Se pretende además aportar evidencias experimentales a diversas hipótesis sobre las bases fisiológicas de la memoria. El presente trabajo se encuentra dividido en tres secciones principales que corresponden a una sección de antecedentes, una sección experimental y una sección de discusión general y conclusiones.

La sección de antecedentes describe el marco conceptual y teórico en el que se encuadra este trabajo, así como las evidencias experimentales más relevantes en las que se apoya; se encuentra a su vez dividido en seis capítulos cada uno describiendo aspectos generales de los métodos y técnicas utilizadas a lo largo de los experimentos. El capítulo 1 describe el marco conceptual en el que se encuentran los presentes estudios y su respectiva discusión, así como un breve análisis personal acerca del estudio de la memoria, a manera de justificación teórica. El capítulo 2 es una descripción del modelo del condicionamiento aversivo a los sabores y de las peculiaridades de éste dentro de las teorías del aprendizaje y la memoria, así como dos interpretaciones posibles relevantes al presente trabajo. En el capítulo 3 se describe la anatomía general y características funcionales de la corteza insular de la rata, una estructura para la cual existe amplia evidencia de su

participación en el condicionamiento aversivo a los sabores. Se describe a continuación en el capítulo 4 la historia y estudios más importantes de la técnica de implantación de tejido fetal cerebral en la recuperación funcional y en el capítulo 5 la utilización del factor de crecimiento neuronal con ésta técnica y su relevancia en los estudios de recuperación funcional. Estos dos capítulos se incluyen dado que en los experimentos realizados en éste trabajo se decidió utilizar estas técnicas para obtener la información necesaria, por lo que se presentan para esclarecer el motivo y el objetivo de utilizarlas. Finalmente en el capítulo 6 se describen los estudios que en los últimos años se han realizado con el fin de dilucidar el papel que la corteza insular desempeña en diversos modelos de condicionamiento, con especial énfasis en los que utilizaron las técnicas descritas en los capítulos anteriores; de tal manera que éste capítulo conforma un apartado que describe los antecedentes directos al presente trabajo.

En la sección experimental se describen los dos experimentos realizados, indicando los objetivos específicos de cada uno, así como los materiales y métodos utilizados, los resultados obtenidos y una discusión particular de los resultados de cada experimento.

Finalmente se presenta una sección de discusión general, en donde los resultados de los dos experimentos son discutidos en conjunto en términos de las implicaciones teóricas y conceptuales que se derivan de los resultados, además de presentarse las conclusiones obtenidas.

ANTECEDENTES.

Capítulo 1.

Consideraciones Generales sobre la Neurofisiología de la Memoria.

El aprendizaje y la memoria exhiben varios aspectos fenomenológicos diferentes de acuerdo al nivel de análisis que el observador realice. El problema puede ser atacado enfocándose en conducta compleja e interacción informática con el medio ambiente, o en comunicación interneuronal y relaciones entre estructuras del sistema nervioso central, o bien, inclusive en procesamiento de señales y transducción al nivel celular o molecular. Sin embargo la estructura funcional de un sistema (p.e. la memoria) puede concebirse como definida por el número y propiedades de sus relaciones mutuas o conexiones. Un cambio en las relaciones de entrada-salida de un sistema supone la alteración de su estructura funcional, aunque no todo cambio produce alteraciones generalizadas en el sistema, ya que la misma relación entrada-salida puede ser realizada por diferentes estructuras funcionales.

La base física de éstas estructuras funcionales, que no necesariamente están en la misma localización anatómica, son las células del sistema nervioso central (SNC), principalmente las neuronas. La estructura funcional que conforma la memoria debe, por tanto, tener ésta base física. El atribuir a la memoria características del sustrato neurofisiológico implica la localización de estructuras

neuronales cuya conectividad cambie, produciendo vías neuronales nuevas con mayor preferencia que en última instancia representa el trazo de memoria, la base material de la información almacenada. Esta sugerencia no debe excluir la participación de varias subestructuras diversas del sistema nervioso central; sin embargo esta "localización distribuida del trazo de memoria" debe distinguirse de una "memoria distribuida", dado que este último concepto implicaría una equipotencialidad de todas las estructuras del SNC para cualquier tarea de memoria, lo cual ha sido descartado por estudios de los últimos 50 años. El principio de equipotencialidad de área postulado por Karl S. Lashley en su ya clásico trabajo de 1950 dice que "...el trazo de memoria está localizado en todas partes del área funcional; que varias partes son equipotenciales para su mantenimiento y activación". (p.301, el subrayado y traducción es nuestro). El postulado limita la equipotencialidad al área funcional específica de cada trazo de memoria, sin embargo excluye que el trazo se encuentre distribuido homogéneamente en la corteza. Esta aclaración es importante dado que en varias ocasiones se ha citado erróneamente estos hallazgos como prueba de que es todo el cerebro el que participa en el mismo grado en la formación de la memoria. En particular los trabajos de Lashley mostraron que un área funcional del cerebro involucrada en una tarea, por ejemplo la corteza visual en tareas espaciales, si era lesionada en varias localizaciones dentro de ésta área funcional, producía un déficit igual, independientemente del locus de la lesión dentro del área. Sin embargo, sí encontró una correlación positiva entre el tamaño de la lesión y el grado de impedimento en la ejecución de la tarea. Estudios más recientes,

principalmente en el molusco *aplysia* (Kandel, 1987) y en el reflejo de la membrana nictitante del conejo (Thompson, 1986), han puesto en tela de juicio este postulado en su forma original, demostrando especificidad neuronal dentro de las áreas funcionales. En éstos trabajos se han podido mapear las vías de la formación del trazo de memoria neurona por neurona, mostrando que algunas de ellas son indispensables en el proceso, por lo que un locus tan restringido como lo es la neurona puede afectar la memoria, lo cual contradice al postulado de Lashley. Sin embargo este postulado ha servido como principio para un sinnúmero de estudios sobre la neurofisiología de la memoria y parece conservarse salvo en los trabajos mencionados. De ésta manera, la búsqueda de áreas funcionales involucradas en tareas específicas de memoria permanece más como la regla y no la excepción.

La sola identificación de un área funcional necesaria para el mantenimiento de un trazo de memoria no es suficiente para la cabal comprensión de los mecanismos subyacentes a la formación, retención y evocación del trazo. La distinción comúnmente aceptada entre memoria de largo plazo (MLP) y memoria de corto plazo (MCP) deriva de los estudios clásicos de Ebbinghaus a fines del siglo pasado, quien sugirió que después de que la información fuera almacenada en la MCP, ciertos procesos dependientes del tiempo eran necesarios para consolidar un trazo de memoria a largo plazo. También encontró que durante la MCP y la consolidación de la MLP el trazo era muy sensible a varias intervenciones; pero cuando la memoria estaba consolidada, era relativamente estable e insensible a disturbios. Numerosos estudios en animales usando

diferentes influencias experimentales confirman estas sugerencias y encontraron de manera más precisa el curso temporal de la MCP y de la consolidación de la MLP (Duncan, 1949; Flexner, Flexner y Steller, 1963; Mc Gaugh, 1966; Agranoff, Davis, Casola y Lim, 1967; Flood, et al., 1986).

Rescorla y Holland en 1982, señalaron un problema en el estudio de la memoria que había sido descuidado por la gran mayoría de las investigaciones: el problema de la expresión del aprendizaje. La observación de que en el condicionamiento pavloviano la respuesta condicionada rara vez era idéntica a la respuesta incondicionada, llevó a algunos autores (p.e. Rescorla, 1988) a postular que la expresión o evocación de las respuestas aprendidas era un proceso relativamente independiente del aprendizaje. Ha existido un descuido histórico de los temas de la expresión en el campo del aprendizaje animal. Ha habido por mucho tiempo en nuestro campo una disposición para tratar al aprendizaje como inseparable de la respuesta usada para medirlo. Una interpretación superficial de la orientación estímulo-respuesta de Thorndike contribuyó en gran medida esta distorsión, así como del positivismo lógico ortodoxo, opacando la distinción entre los experimentos, que necesariamente miden una respuesta particular a un estímulo particular, y las interpretaciones teóricas de lo que es aprendido, y por tanto del distinto proceso de evocación. De tal manera que el proceso tradicionalmente llamado aprendizaje, puede ser concebido como una suma de varias fases consistentes en : a) Adquisición, o aprendizaje propiamente dicho, en donde el organismo es expuesto a los cambios del medio físico que constituyen los

estímulos que se asocian o son contingentes. b) Consolidación, en donde se activan mecanismos que permitan una cierta permanencia de la experiencia concreta recién percibida. c) Retención, un proceso pasivo o activo por medio del cual el organismo es capaz de expresar en el tiempo los efectos del aprendizaje en varias ocasiones; y d) Evocación, expresión de conductas determinadas por experiencias de aprendizaje anteriores (fig 1). Esta separación en fases no ha sido explícitamente marcada por la literatura y solo constituye una propuesta con la cual poder formular preguntas concretas de investigación. Se incluyen aquí de manera explícita con el fin de dar mayor claridad a este trabajo en particular, aunque en la mayoría de los trabajos de neurofisiología del aprendizaje y la memoria se utilizan diversos enfoques que no siempre son explícitos, o cada línea de investigación utiliza uno distinto.

Las tres primeras fases del contínuo arriba descrito no son en realidad observables, al menos en el estado actual de su estudio, sin embargo son inferibles a partir de los diferentes efectos observados en la evocación de la respuesta. Es de notarse que en esta visión es posible aceptar, al menos en teoría, la posibilidad de que un animal haya aprendido alguna asociación de estímulos sin que lo haya expresado. La aceptación de esto es vital en el estudio neurofisiológico de la memoria dado que gran parte de las manipulaciones, tales como lesiones, se realizan durante alguna o algunas de las fases inferidas y no necesariamente antes del aprendizaje, además de resaltar el problema de que las manipulaciones experimentales previas al aprendizaje pueden estar afectando solo alguna o

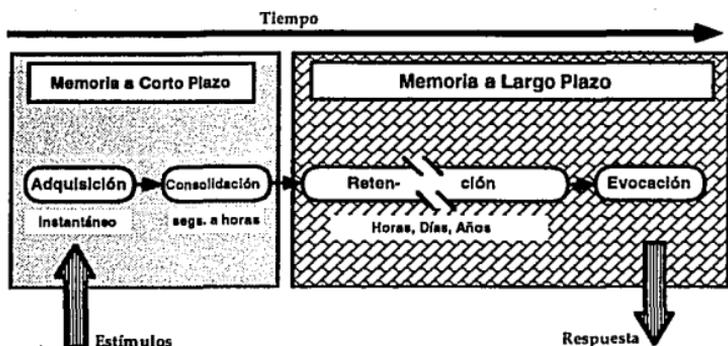


Figura 1. El continuo aprendizaje-evocación. En el lado derecho se muestran la adquisición (presentación de una contingencia de estímulos) y la consolidación (retención por corto tiempo de esta información, así como la transformación a memoria de largo plazo), que son las dos etapas que pertenecen a la memoria a corto plazo. A la izquierda se muestran la retención (mantener latente la capacidad de respuesta en el tiempo) y la evocación (la emisión de la respuesta ante los estímulos adecuados), ambas etapas de la memoria a largo plazo.

algunas de estas fases y no el proceso íntegro y total (para una revisión de este problema, ver Spear, Miller y Jagielo, 1990).

Cada modelo conductual de aprendizaje y memoria puede ser revalorado tomando en cuenta estas cuatro fases, y el éxito de este análisis dependerá en gran medida de las características propias del modelo y no solo de la cantidad de

evidencia experimental. Un modelo conductual que pone de manifiesto la necesidad del replanteamiento del supuesto de que la conducta aprendida es una sola unidad indivisible, es el condicionamiento aversivo a los sabores que se revisará en el siguiente capítulo.

Capítulo 2.

El Condicionamiento Aversivo a los Sabores.

El condicionamiento aversivo a sabores es un paradigma que básicamente consiste en la presentación de un sabor seguido por un malestar o envenenamiento, lo cual produce que los animales eviten ingerir sustancias que tengan el sabor.

La descripción hecha en 1955 por Garcia, Kimeldorf y Koelling de una aversión condicionada a la sacarina inducida por exposición a rayos gamma, no solo causó gran interés por demostrar que la radiación gamma podría constituir un estímulo conductual, tomando en cuenta que antes de ello se consideraba imperceptible, sino también por la peculiaridad de que bastaba un solo apareamiento para producir una respuesta robusta. El problema se complicó más cuando estudios posteriores demostraron que la aversión se continuaba presentando aún cuando el intervalo entre la presentación del sabor y del malestar fuera de varias horas (Garcia y Koelling, 1966). Estas peculiaridades no pudieron ser fácilmente explicadas por el marco teórico prevalente de aprendizaje y memoria como se indica a continuación.

En el paradigma pavloviano, un estímulo (estímulo incondicionado, EI) que elicitaba una respuesta (respuesta incondicionada, RI) es apareado con otro estímulo (estímulo condicionado, EC) que no elicitaba la respuesta RI. Los dos estímulos son apareados de tal manera que sean contiguos y que el EC pueda proveer información acerca del EI (Pavlov, 1927/1994). El aprendizaje se puede inferir cuando la presentación del EC produce una respuesta similar a la RI, denominada respuesta condicionada (RC).

Aunque se puede considerar al condicionamiento aversivo a los sabores como una forma de condicionamiento clásico, no cae dentro del modelo de cuatro variables arriba descrito. El estímulo gustativo puede identificarse como el EC, dado que no produce una respuesta aversiva por sí mismo. El malestar puede identificarse como el EI y la evitación del sabor como la RC. No existe, sin embargo, una RI claramente identificable. El condicionamiento aversivo al sabor puede ocurrir sin una RI observable (García, McGowan y Green, 1972). Generalmente se ha aceptado conceptualizar a este paradigma con solo las tres variables evidentes, sin embargo, se han postulado soluciones para obtener una conceptualización más adecuada.

Una solución al problema la postuló K.C. Chambers (1990) a partir de diversos estudios en donde se analiza detalladamente la situación de aprendizaje. Los estímulos gustativos pueden elicitarse respuestas conductuales antes de la absorción del alimento además de las respuestas fisiológicas tales como salivación

y secreción de insulina. Los sabores que presentan una preferencia, tales como dulce, evocan respuestas de consumo incrementadas, y los sabores evitados, tales como amargo, evocan respuestas de consumo decrementadas y evitación del comedero (Rozin, 1967). Respuestas conductuales a estímulos gustativos más complejas han sido reportadas por Grill y Norgren (1978). Ante los estímulos dulces los animales mostraban movimientos rítmicos de la mandíbula con protusiones y retracciones de la lengua resultando en una mayor ingesta. Ante los estímulos amargos, en cambio, las protusiones de la lengua eran más largas y las retracciones se llevaban a cabo con la mandíbula casi cerrada, lo que producía que el líquido se vertiera fuera de la boca y, por ende, menor ingesta. Cuando los animales sufren malestar después del consumo de una sustancia, producía las conductas características de un sabor amargo.

Se puede así identificar una RI de aversión a sabores, aunque sigue el problema de que esta RI no se presenta con la presentación del EI; se puede observar que el malestar altera la respuesta elicitada por el sabor. Aunque la respuesta al EC es apropiada a la presentación del EI en que el malestar frecuentemente produce decrementos en el consumo, en el condicionamiento aversivo al sabor el decremento no es general como en el caso del malestar, sino específico al EC. La RC no es similar a la respuesta elicitada por el EC antes del condicionamiento, de hecho es opuesta. Consecuentemente el EI no actúa como el elicitor de lo que serán las características esenciales de la RC, sino que cambia la

respuesta elicitada por el EC de una forma (ingestiva) a otra (aversiva) (Chamblers, 1990).

Una segunda aproximación teórica para resolver el problema de las peculiaridades del condicionamiento aversivo a los sabores fué propuesta recientemente por el mismo García (1990). En su propuesta hace una reevaluación del planteamiento pavloviano original (Pavlov, 1927/1994). En éste planteamiento el estímulo incondicionado juega un doble papel: En primer lugar es un estímulo a ser asociado con otro, el EC, formando la díada EC-EI. En segundo lugar se asocia con un factor llamado retroalimentación (RA) formando la díada EI-RA. El último factor es una propuesta novedosa en teoría del aprendizaje, que intenta llenar las dos brechas teóricas destacadas por Skinner (1989) en donde afirma que en cualquier descripción conductual tiene dos brechas: una entre la acción estimuladora del ambiente y la respuesta del organismo, y otra entre las consecuencias y el cambio conductual resultante. La solución propuesta por Skinner (1989) a estos dos vacíos teóricos es no incluir su estudio a los analistas de la conducta, y dejar el estudio de la "caja negra" a aquellos que tengan los métodos y los instrumentos adecuados para su estudio, p.e. fisiológicos.

En la propuesta de García (1990), el primer vacío teórico correspondería a la díada EC-EI y el segundo vacío teórico sería el EI-RA. La retroalimentación (RA) consiste en todos los fenómenos fisiológicos y neurales derivados de la presentación del EI, lo cual produce una transposición del valor hedónico que tenía

el EI originalmente, en el caso del condicionamiento aversivo al sabor el estímulo sávido es el EI (a diferencia de la propuesta anterior, en el que el sabor es el EC), con una RI consumatoria; al presentarse después el malestar gástrico (RA) el sabor sufre un cambio en su valor hedónico convirtiéndose de agradable a aversivo, de tal manera que al volverse a presentar el sabor la RI habrá cambiado a una evitación (RC).

El enfoque EC-EI-RA implica que el estudio conductual no puede estar asilado de su sustento fisiológico lo que aporta una visión de mayor interdisciplinariedad. La aceptación de este punto de vista dentro de las investigaciones sobre teoría del aprendizaje es un punto que excede al enfoque del presente trabajo, pero se tiene que admitir que ha sido un fundamento, implícito o explícito, de un sinnúmero de investigaciones en neurofisiología de la conducta y etología, avalado por una larga trayectoria de evidencia experimental (para una revisión del origen e inclusión de ésta visión en la ciencia actual, véase Lubek y Apfelbaum, 1987).

El modelo del condicionamiento aversivo a los sabores en particular ha sido un valioso instrumento en el estudio de las bases neurofisiológicas de aprendizaje y la memoria, probablemente debido a que las estructuras nerviosas involucradas en esta conducta parecen estar bien definidas y localizadas (Kiefer, 1985), facilitando así aproximaciones que intentan dilucidar los mecanismos involucrados. En particular el estudio de la participación de la corteza insular de la

rata en éste condicionamiento ha generado valiosas hipótesis acerca de los mecanismos de adquisición, retención y evocación de repuestas condicionadas complejas. A continuación se presentará el estado actual del estudio de ésta estructura cerebral.

Capítulo 3.

La Corteza Insular de la Rata.

Una de las estructuras más importantes que se han descrito para el CAS, es la corteza insular. Esta estructura juega un papel de vital importancia en la integración neural del condicionamiento aversivo a los sabores, dada su posición anatomofuncional dentro de las estructuras involucradas en esta clase de aprendizaje.

La anatomía del sentido del gusto ha sido uno de los que menos información se ha recopilado, posiblemente por la dificultad que presenta el estudio de los sentidos químicos, y también debido a que hasta la segunda mitad de éste siglo se le considera como un sentido de "lujo" con valor hedónico pero sin gran valor adaptativo (Patton, 1950). Tal visión ha sido puesta en tela de juicio dado que las conductas consumatorias (tales como ingerir nutrientes y evitar venenos) juegan un papel central en la sobrevivencia del organismo.

Los sustratos anatómicos que se han descrito hasta ahora para el sentido del gusto comienzan con activación de receptores linguales conectados principalmente con los nervios craneales facial (VII) y glosofaríngeo (IX) y en menor medida por el par craneal vago (X). Estas fibras se conectan directamente con la porción anterior

del núcleo del tracto solitario (NTS) en el tallo cerebral (Patton, 1950). A este nivel ya están los mecanismos neurales suficientes para que exista una discriminación incondicionada de los sabores, demostrado por el hecho que ratas decerebradas (con un corte transversal a través del puente, interrumpiendo a todas las fibras ascendentes que salen del NTS) son capaces de mostrar reacciones de aceptación-rechazo a sabores y mostrando además un umbral normal al sabor (Grill y Norgren, 1978).

Las fibras ascendentes que salen del NTS van principalmente al núcleo parabraquial del puente, también conocido como area pontina del sabor; en donde comienza a realizarse una cierta integración de los sabores, mostrado por el hecho de que la inactivación temporal de éste núcleo no permiten el condicionamiento a sabores pero sí su percepción (Ivanova y Bures, 1990; Gallo y Bures, 1991). A partir del núcleo parabraquial del puente las fibras pueden seguir una de dos vías (fig 2). Uno de los grupos de fibras van a diversas estructuras de cerebro ventral tales como la amígdala central (que parece recibir fibras directamente del NTS) el hipotálamo lateral distal y la substancia innominata (Norgren, 1974). El segundo grupo de fibras se proyecta al núcleo ventromedial del tálamo, muy cerca de la región lingual (Pfaffman, Frank y Norgren, 1979). A partir de los núcleos talámicos las fibras se proyectan hacia la neocorteza gustativa, concluyendo en la corteza insular (áreas 13 y 14 de Brocca) (Kiefer, 1985).

La asociación que las vías descritas del gusto tienen con las vías viscerales para producir el CAS se lleva a cabo desde el NTS, en donde llegan las fibras del nervio craneal vago (X) que innervan a las vísceras bajas. (Borison y Wang, 1953). Existe una segunda vía por la cual se puede inducir el proceso emético (nausea);

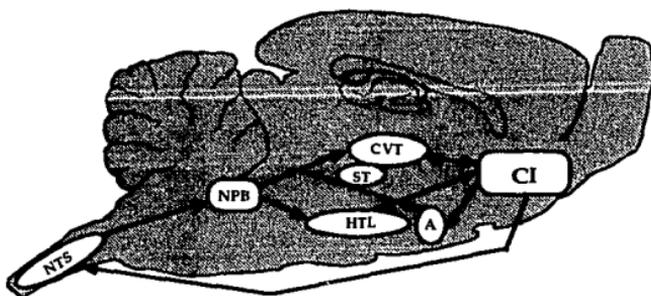


Figura 2. Principales conexiones de la corteza insular con otros núcleos del cerebro. Abreviaturas: (NTS) núcleo del tracto solitario, (NPB) núcleo parabraquial del puente, (CVT) complejo ventrobasal del tálamo, (ST) núcleo subtalámico, (HTL) hipotálamo lateral, (A) amígdala y (CI) corteza insular.

la vía sanguínea. En la pared ventral del cuarto ventrículo existe un núcleo llamado área postrema en el cual la barrera hematoencefálica es muy débil, por lo que este núcleo es capaz de detectar sustancias tales como toxinas en la sangre e inducir así el vómito (Borison y Wang, 1953). Estas dos vías parecen aportar de manera independiente información suficiente para producir emesis. Por ejemplo, si se administra una solución de sulfato cúprico por intubación del intestino

contingentemente a un sabor, en ratas vagotomizadas subdiafragmalmente no hay CAS pero no hay impedimento si son lesionadas en el área postrema. De manera inversa, si la solución de sulfato cúprico se administra intravenosamente la lesión vagal no tiene efecto y los animales lesionados en el área postrema se hallan impedidos para adquirir el CAS. (Coil y Norgren, 1981). Existen sustancias tales como el cloruro de litio (LiCl) que administradas intraperitonealmente parecen actuar utilizando las dos vías descritas.

En 1955, Benjamin y Pfaffman describieron un área nerviosa cortical del gusto en la rata, como un región de aproximadamente 1x3 mm de corteza atravesado por la arteria cerebral media y adyacente a, pero distinguiblemente arriba del surco rinal. En base a las relaciones establecidas entre esta área y el núcleo ventrobasal del tálamo, un criterio neuroanatómico clásico de "neocorteza sensorial" fué aplicado al área gustativa. Yamamoto, Yayama y Kawamura (1981) identificaron en un área denominada neocorteza gustativa, células responsivas al tacto, estimulación termal y gusto en la lengua de ratas, identificando que las responsivas al gusto se concentraban mayormente en la región ventral del área descrita, en la estructura denominada corteza insular. Anteriormente a esto Norgren y Wolf (1975) localizaron que la mayoría de las neuronas gustativas del núcleo ventral posterior del tálamo proyectaban además a esta estructura, por la que la corteza insular se considera la proyección cortical del gusto.

Braun, Lasiter y Kiefer (1982) mostraron que el papel que juega el área cortical del gusto en la percepción sensorial es diferente al que se ha observado para las otras modalidades sensoriales, cuya lesión impedia al organismo para la percepción. En el caso del área cortical gustativa, como lo sugerían los estudios mencionados de Grill y Norgren (1978), la ablación de esta estructura no produce déficits en la percepción gruesa de los sabores, y sus correspondientes respuestas incondicionadas de aceptación-rechazo; aunque parece haber una leve disminución en la capacidad de discriminación fina entre dos concentraciones de una solución sávida.

Uno de los resultados más llamativos dentro del estudio de la funcionalidad de cualquier estructura cerebral, es la capacidad de recuperar su función a través del trasplante de tejido fetal cerebral, si esta estructura se encuentra lesionada. El caso de la corteza insular se halla en esta situación, por lo que la utilización de esta técnica puede ser fuente de mayor evidencia que acerque más al entendimiento del aprendizaje y la memoria desde el punto de vista neurofisiológico.

Capítulo 4.

Los Implantes de Tejido Cerebral.

La técnica de transplatación de órganos ha sido estudiada desde hace más de un siglo, incluido el tejido nervioso. Esta técnica no solo aporta una manera más de combatir patologías, mediante la implantación de un órgano sano en lugar de uno deficiente, sino que además aporta una gran cantidad de información acerca del funcionamiento (normal y anormal) del órgano involucrado, siendo así un método utilizado frecuentemente en la investigación básica. En el caso de los tejidos cerebrales, los primeros trabajos en transplantes (ver Tabla I) se limitaron a describir la capacidad de éstos para mostrar supervivencia en el nuevo medio, con resultados desiguales y difícilmente reproducibles.

En 1969 apareció un trabajo de Raisman que aportó evidencias de que el tejido cerebral en el septum desafrentado presentaba crecimiento y formación de nuevas fibras en las células, lo que produjo que se reconsiderase la posibilidad de que el tejido del sistema nervioso central tuviera capacidad regenerativa. Antes de ésta fecha, el tejido nervioso de los mamíferos era considerado como una estructura estática y por lo tanto incapaz de una regeneración, o de un crecimiento en etapas posteriores a etapas tempranas del desarrollo; esto implicaba que el daño en el sistema nervioso central era anatómicamente irreversible, aunque si existía

alguna evidencia de recuperación conductual, pero ésta era atribuída al desarrollo de una hipersensibilidad de las neuronas restantes o a la utilización de vías alternas (Teuber, 1974). En la visión actual es ampliamente aceptado que el tejido nervioso tiene procesos que promueven la recuperación funcional, después del daño a alguna estructura del sistema. En algunas ocasiones la recuperación no se dá por sí misma, pero puede ser inducida o acelerada mediante la adición de algún tratamiento a la región dañada, en éstos casos los trasplantes han mostrado una gran utilidad (Dunnet y Björklund, 1987).

Después de la primera década de estudios sobre trasplantes de tejido cerebral, surgieron una serie de preceptos que describen las condiciones en las cuales los trasplantes pueden ser capaces de inducir recuperación funcional (Steveni, Björklund y Svengaard, 1976). En breve, el tejido del sistema nervioso central solo es viable como trasplante cuando el donador esta en desarrollo, y mejor si es embrionario. Parece ser que existe un tiempo límite de desarrollo durante el cual debe obtenerse el tejido transplantado. Este tiempo difiere para cada población de neuronas, y parece corresponder al final de la mitosis, (Seiger, 1985). Aunque Jeager y Lund (1980) consideran que el éxito del trasplante depende de la capacidad proliferativa de las células del donador. Es necesario seleccionar el sitio del trasplante en el huésped. Debe estar altamente vascularizado y proveer de soporte y rápida incorporación con vasos y circulación del fluido cerebrospinal del huésped. Existen cavidades naturales. como los ventrículos, la cámara anterior del ojo, que llenan estos requisitos.

Tabla I. Cronología de los estudios más relevantes en trasplantes de tejido hacia el cerebro (Modificada de Björklund y Steveni, 1985).

Año	Autor(es)	Estudio
1890	W.G. Thompson (EUA)	Primer intento de trasplante de tejido adulto a la corteza cerebral del gato y del perro.
1907	G. del Conte (Italia)	Intento de trasplante de tejido embionario no cerebral de perros adultos.
1911	F. Tello (España)	Primer trasplante exitoso de tejido nervioso periférico a la corteza cerebral, en conejo.
1917	E. Durnn (EUA)	Primer trasplante exitoso de corteza cerebral de una rata neonatal a la corteza de otra neonatal (el trasplante mostró cierta laminación).
1940	W.E. Le Gross Clark (Inglaterra)	Primer trasplante exitoso de tejido cortical fetal a corteza de neonatos, en conejo y en rata.
1961	R. Alvarez-Buylla (México)	Primer trasplante de glándula suprarrenal en la silla turca de perro, previa extracción de la hipófisis.
1970	L. Olson, et al. (Suecia) G.D. Das, et al. (EUA) A. Björklund, et al. (Suecia)	Primeros trasplantes exitosos de tejido fetal en diversas áreas del SNC de ratas y conejos adultos.
1980	W. Freed (EUA)	Primer trasplante de médula adrenal al ventrículo lateral con recuperación funcional, en ratas.
1984	O. Olson, et al. (Suecia)	Primeros trasplantes de médula adrenal al cerebro humano.
1986	I. Madrazo, et al. (México)	
1985-»	Varios autores	Biología molecular aplicada en trasplantes cerebrales.

Alternativamente, se puede elaborar artificialmente una cavidad que reciba al implante; esta cavidad se revasculariza al cabo de un tiempo (generalmente en 15 días) y constituye un sitio adecuado para sostener el crecimiento del tejido, ya que los vasos sanguíneos que recubren la cavidad dotarán al trasplante con el aporte sanguíneo necesario para su supervivencia (Stenevi et al., 1976). Las reacciones inmunológicas desencadenadas por los trasplantes no afectan el desarrollo de los mismos, esto es, el cerebro huésped acepta al tejido extraño a diferencia de lo que ocurre con trasplantes de cualquier otro órgano (Stenevi et al., 1976). El concepto del cerebro como un sitio "inmunológicamente privilegiado", cuyo origen se remonta a los trabajos de principios de siglo de Shirai (1921/1985), se sabe hoy en día que es parcial (Freed, Dymecki, Poltorak y Rogers, 1988). En algunos casos en el que el donador y el receptor son de diferente especie, se puede observar rechazo del tejido y solamente con la utilización de drogas inmunosupresoras es posible evitar tal fenómeno (Brundin, Nilsson, Gage y Björklund, 1985). Los tres preceptos básicos anteriores publicados por Stenevi et al. en 1976, han sido confirmados por innumerables trabajos que se han elaborado hasta ahora. Así, se han desarrollado una serie de técnicas para transplantar tejido cerebral y estudiado las condiciones necesarias tendientes a optimizarlas. (para una revisión exhaustiva ver Björklund y Stenevi, 1984, 1985).

De estos trabajos, podemos resumir que el crecimiento y organización intrínseca del tejido transplantado en el SNC puede variar en función de una gran

variedad de parámetros: diferencias en el proceso de disección, en el volumen de tejido transplantado, en el estadio de diferenciación en el que se encuentran sus células y en las propiedades del sitio donde el tejido será colocado.

Además de los estudios relacionados con la supervivencia y el desarrollo de los trasplantes, estos han sido analizados desde otro punto de vista: su funcionalidad. La estrecha relación existente entre el hospedero y el trasplante se manifiesta funcionalmente en la conducta del animal receptor de diversas maneras. Una gran cantidad de modelos de estudio han revelado diversos mecanismos mediante los cuales es posible que los trasplantes modifiquen la conducta del animal receptor (Dunnet y Björklund, 1987; Björklund et al., 1987; Freed, Medinaceli y Wyatt, 1985; Cotman y Kesslak, 1988).

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

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

-Reestablecimiento de conexiones: diversos autores han observado una integración completa del trasplante y el huésped por medio del establecimiento de conexiones recíprocas entre ambos. (Wictorin, Simerly, Isacson y Björklund, 1989). Se ha encontrado que las reconexiones se efectúan de manera precisa cuando se utiliza un receptor en desarrollo que haya sido deaferentado por medio de una lesión, aunque la reconectividad recíproca puede observarse también en hospederos adultos (Dunnett y Björklund, 1987). Otro aspecto de la reconectividad es la acción que ejercen las proyecciones del trasplante hacia el hospedero. Al respecto, la liberación de neurotransmisor tónica y autorregulada de la neurona presináptica (del trasplante), puede ser suficiente para que las neuronas postsinápticas sean nuevamente funcionales (Björklund et al., 1987; Dunnett y Björklund, 1987; Freed et al., 1985).

-Interacciones tróficas: se conoce que los trasplantes cerebrales contienen factores tróficos, los cuales pueden actuar in vitro promoviendo la supervivencia de las células nerviosas, el crecimiento de neuritas así como la diferenciación de neuronas periféricas y del SNC. (Cotman y Kesslak, 1988). Algunos autores sugieren que ciertos tipos de factores tróficos (como los que promueven la

supervivencia) se producen como consecuencia de una lesión y que éstos contribuyen a la supervivencia y el crecimiento de los transplantes (Nieto-Sampedro y Cotman, 1986). Parece ser que el cerebro responde al daño produciendo factores tróficos, lo que incrementa la supervivencia neuronal y promueve el crecimiento de neuritas (Cotman y Nieto-Sampedro, 1984); ésta actividad es mayor en las áreas que rodean a la lesión, pero inclusive puede ser muy alta en áreas denervadas distantes a la lesión; por ejemplo, la actividad trófica inducida por la lesión de la porción retrohipocampal, promueve la supervivencia de los transplantes colinérgicos estriatales (Manthorpe et al., 1983) o por la inyección de extractos de cerebro lesionado. Aún más, la lesión específica de un sitio del cerebro puede producir factores que beneficien más a unas células que a otras (Gibbs et al., 1986).

-Liberación de hormonas o de neurotransmisores: se ha postulado que las células que componen al trasplante liberan factores humorales hacia el hospedero (neurotransmisores u hormonas) y que las neuronas sensibles a las moléculas expulsadas recuperan su actividad. Por ejemplo, los transplantes intraventriculares del área preóptica, que contienen altas cantidades de hormona liberadora de gonadotropinas, son capaces de establecer funciones gonadales normales en sujetos con deficiencias genéticas en la producción de tal hormona (Gibson y Krieger, 1985). Por otro lado algunos autores han reportado la recuperación del control motor de ratas con lesiones en el sistema nigro-estriatal, debido a transplantes de sustancia nigra o de células de la médula

adrenal, las cuales se piensa que ejercen su acción por medio de la liberación de dopamina (Dunnett, Isacson, Sirinathsinghi, Clarke y Björklund, 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, si no es que en todos los casos, el reestablecimiento de una función, es el resultado de la acción de varios factores. La importancia de cada factor en la recuperación funcional dependerá en última instancia, del modelo experimental que se esté abordando. Dentro de éstos factores, recientemente ha destacado el papel del factor de crecimiento neuronal, no solo por su efecto sobre células transplantadas, sino por su capacidad de producir recuperación anatómica y funcional de lesiones. Estudios realizados utilizando el modelo del condicionamiento aversivo a los sabores y la corteza insular, han mostrado una participación de éste factor en la recuperación (Escobar, Russell, Booth y Bermúdez-Rattoni, en prensa). Por lo que cabe una entrada al respecto de éste factor neurotrófico.

Capítulo 5.

El Factor de Crecimiento Neuronal.

El sistema nervioso central se caracteriza por ser una estructura en la cual se halla una gran diversidad celular, particularmente en los mamíferos. El origen de esta diversidad, que es el sustento de sus funciones, es debida a diversos fenómenos que ocurren principalmente en etapas tempranas del desarrollo, pero que continúan presentándose aún en el animal adulto. Los mecanismos propuestos que subyacen a la diferenciación son la proliferación celular, que determina el número de células que el sistema tendrá; el crecimiento celular, encargado de la definición de la función que tendrá una célula; la diferenciación celular, que permite que células que tienen un mismo origen puedan eventualmente realizar funciones diferentes; la migración, que define la posición anatómica de las diferentes células que cada estructura tendrá; y por último la formación de sinápsis o de comunicación intercelular, que es la que en última instancia determina la función de cada célula dentro de todo el sistema.

Los mecanismos arriba propuestos dependen de la comunicación celular, que en el caso del SNC se lleva a cabo principalmente por mediadores químicos, tales como los neurotransmisores. Existen además de los neurotransmisores una gran variedad de moléculas encargadas de la comunicación celular, entre los

cuales son de notar los factores tróficos o también denominados factores neurotróficos. Los factores neurotróficos se han definido como péptidos o proteínas capaces de controlar la sobrevivencia, el crecimiento y las capacidades funcionales de poblaciones específicas de neuronas (Varon, Hagg, Vahlsing y Manthorpe, 1989). El término trófico proviene de la primera idea de que éstos factores servían como "alimento" (trofos=comida) para el sustento de las células, aunque ahora se sabe que en realidad realizan funciones metabólicas muy diversas e intrincadas que poco tienen que ver con el consumo de productos energéticos. A partir de los diversos estudios que se han realizado, se ha postulado la hipótesis neurotrófica del SNC (Hefti, 1986; Varon et al., 1989), que señala que las neuronas del SNC adulto dependen de factores neurotróficos para su mantenimiento, función y reparación, por lo que deficiencias de factores neurotróficos endógenos ocasionan disfunción, hipotrofia y degeneración. La administración exógena de factores neurotróficos previene, o inclusive corrige los daños producidos por lesiones degenerativas o traumáticas.

El estudio de los factores tróficos se remonta a 1951, cuando Rita Levi-Montalcini y Victor Hamburger observaron que ciertos tumores de ratón implantados en embriones de pollo producían un factor difusible que causaba un notable crecimiento de los ganglios simpáticos y sensoriales del sistema nervioso periférico, además las neuronas de estos ganglios presentaban una emisión incrementada de neuritas y procesos (Levi-Montalcini y Hamburger, 1953). Este

factor defusible fue posteriormente identificado como un polipéptido bioactivo y fue llamado factor de crecimiento neuronal (FCN).

El papel que juega en FCN sobre la recuperación del sistema nervioso ha sido ampliamente estudiado, encontrándose amplia evidencia de que la producción de FCN en regiones específicas de la periferia determina la densidad de inervación por neuronas del sistema nervioso periférico sensibles a FCN (Thoenen y Barde, 1980). De manera más reciente se ha demostrado que el FCN incrementa la capacidad de recuperación de áreas del SNC lesionadas e induce un incremento en la síntesis de colinacetyl-transferasa, que es la enzima encargada de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina, en algunas estructuras del SNC como son el cerebro basal y el hipocampo (Korsching, Auburger, Heuman, Scott y Theonen, 1985; Gage y Buzaki, 1986). Estudios farmacológicos han sugerido de manera continua que la acetilcolina está involucrada en un gran número de funciones cerebrales, y es de notar que además en las bases neurofisiológicas del aprendizaje y la memoria.

En la literatura que ha aparecido en los últimos 15 años acerca de los mecanismos de recuperación inducidos por injertos cerebrales, la presencia y actividad de factores tróficos han sido señalados como de vital importancia para la reconexión implante-huesped. 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

implantes. Así, aparentemente el cerebro responde al daño produciendo factores tróficos que incrementan la sobrevivencia celular y promueven el crecimiento de neuritas.

En el ámbito de los implantes de tejido cerebral fetal, Toniolo, Dunnet, Hefti y Will (1985) encontraron que el FCN incrementa la actividad de la colinacetyltransferasa en las neuronas colinérgicas (que contienen acetilcolina) transplantadas en el hipocampo desafrentado, pero no tiene efectos sobre los implantes colocados en el hipocampo intacto. El implante de glándula sublingual de ratón (tejido rico en FCN) en la fimbria-fornix previamente lesionada, tiene efectos tróficos sobre las neuronas colinérgicas axotomizadas (Springer, Collier, Notter, Loy y Sladek, 1988). Algunas líneas celulares derivadas de la transformación genética de fibroblastos de ratón de tal manera que sintetizan y secretan FCN, al ser implantadas pueden servir como fuentes continuas de FCN, ejerciendo efectos positivos sobre las interneuronas colinérgicas presentes en la corteza (Ernfors, Henschen, Olson y Persson, 1989). Además el implante de fibroblastos genéticamente manipulados para producir FCN ha probado tener efectos protectores sobre los trastornos neurotóxicos que originan neurotoxinas tales como el ácido quinolínico y el quisqualato en diferentes áreas del SNC (Piccardo, Maysinger y Cuello, 1992).

Como se ha mencionado, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que injertos de tejido homotópico en la corteza insular lesionada de

ratas, promueve la recuperación de la habilidad de adquirir un condicionamiento aversivo a un sabor (Bermúdez-Rattoni, Fernández, Sánchez, Aguilar-Roblero y Drucker-Colín, 1987), esta recuperación se presenta hasta los 45 días post-implante, pero no se observa una recuperación ni a los 15 ni 30 días post-transplante (Fernández-Ruiz et al., 1991). Sin embargo, si el implante se realiza en combinación con FCN se puede observar una recuperación inclusive a los 15 días post implante (Bermúdez-Rattoni et al., 1992). Este aceleramiento de la recuperación es específica para tejido homotópico, ya que implantes de Gelfoam, una esponja orgánica reabsorbible, embebido en el FCN no producen recuperación ni tampoco implantes de tejido embrionario tomado de corteza occipital con FCN; ninguna de éstas dos técnicas parecen producir recuperación en los tiempos medidos, ni tampoco a los 130 días, en donde todas las variantes de implantación descritas arriba tienen una reversión y resultan en deficiencias (Escobar, Ormsby, Jiménez y Bermúdez-Rattoni, 1993).

Capítulo 6.

El Papel de la Corteza Insular en el Aprendizaje y la Memoria.

Dentro de las conexiones que pudieran ser importantes en el procesamiento de la memoria están las del sistema límbico; p.e., la amígdala, el núcleo dorsomedial del tálamo y la corteza prefrontal (Krushel y van der Kooy, 1988). Existe gran evidencia que la amígdala está particularmente involucrada en la influencias modulatorias de la memoria de aversiones (McGaugh, Introini-Collinson, Nagahara, Cahill, Brioni y Castellano, 1990). Además existe evidencia de que la amígdala y la CI están funcional y anatómicamente interconectados (Escobar, Fernández, Guevara-Aguilar y Bermúdez-Rattoni, 1989). Se ha sugerido que las proyecciones corticales a la amígdala, incluyendo los de la CI, reciben e integran información de los estímulos la cual es entonces procesada con procesos emocionales y motivacionales (Pascoe y Kapp, 1987).

Varios estudios han demostrado que el área de la corteza insular (CI) está involucrada en la mediación de aspectos condicionados de la respuesta al gusto (Ormsby, Piña y Bermúdez-Rattoni, 1991), pero no está involucrado en las respuestas hedónicas a los sabores. Ratas que son lesionadas en la CI presentan impedimentos en la adquisición y retención de aversiones condicionadas al sabor (CAS). Esto es, cuando las lesiones de la CI se realizan ya sea antes o después de la

adquisición del CAS los animales no mostrarán aversión al sabor. Sin embargo, las respuestas hedónicas de las ratas lesionadas parecen ser normales: Tal como las ratas normales, ratas lesionadas en la CI prefieren sabores dulces como la sacarosa y bajas concentraciones de salina sobre agua sola, y rechazan soluciones amargas como quinina y acidificadas. (Braun, Lasiter y Kiefer, 1982).

La técnica de los trasplantes cerebrales ha sido extensamente utilizada para producir recuperación funcional conductual después de lesiones del cerebro adulto de los mamíferos. Así, se ha establecido que las neuronas transplantadas pueden diferenciarse y hacer conexiones con el cerebro hospedero (Björklund y Steveni, 1985; Dunnet, Ryan, Levin, Reynolds y Bunch, 1987). Se ha demostrado que trasplantes de tejido fetal cerebral pueden producir una recuperación significativa en la habilidad de ratas lesionadas en la CI para adquirir un CAS (Bermúdez-Rattoni et al., 1987). La posibilidad de recuperación espontánea fue excluida, dado que los animales con lesiones de CI que no recibieron trasplantes no pudieron adquirir el CAS inclusive a 8 semanas después de que el trasplante se había administrado a los otros grupos, aún con dos sesiones de adquisición. En contraste, animales con lesiones de la amígdala mostraron una recuperación espontánea ocho semanas después de inducida la lesión. Una posible explicación, es que para la aversión condicionada al sabor la CI pudiera ser una región de almacenamiento permanente, en cambio la amígdala pudiera solo servir para influenciar un paso inicial en el almacenamiento del CAS (Bermúdez-Rattoni et al., 1987). Esto es apoyado por el hecho de que lesiones químicas de la amígdala, inducidas por

microinyecciones de N-metil-D-Aspartato, las cuales se sabe dejan intactas las fibras de paso, no afectaron la adquisición del CAS, en donde lesiones similares de la CI tienen fuertes efectos disruptivos del CAS (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991).

Los experimentos que involucran trasplantes mencionados arriba, fueron hechos con tiempos de espera largos (60 días) entre la implantación y el periodo de entrenamiento post-implante. Un estudio posterior se dedicó a la observación de la recuperación funcional en diferentes tiempos (Fernández-Ruiz, Escobar, Piña, Díaz-Cintra, Cintra-McGlone y Bermúdez-Rattoni, 1991). En este estudio se utilizaron ratas lesionadas en la CI que mostraban impedimento en la capacidad de adquirir el CAS, los animales recibieron trasplantes de tejido fetal tomados de la área correspondiente de la CI (homotópicos) y reentrenados a los 15, 30, 45 y 60 días después del trasplante. Los resultados conductuales mostraron una recuperación casi completa a los 60 días, una recuperación moderada a los 30 y 45 días, y casi ninguna recuperación a los 15 días post-trasplante. Métodos histoquímicos utilizando el trazador retrógrado Peroxidasa de Rábano revelaron que a los 15 días no habían células marcadas con la peroxidasa ni en el núcleo ventrobasal del tálamo ni en la amígdala. A los 30, 45 y 60 días post-trasplante se observó un número cada vez mayor de conexiones con el tálamo y la amígdala, lo que es congruente con estudios anteriores en donde se demuestra que la conectividad con éstos núcleos es importante para la recuperación inducida por trasplantes (Escobar et al., 1989). Sin embargo, diversos autores han sugerido que

la integridad estructural y morfológica de los transplantes puede no ser esencial para la recuperación conductual después de lesiones cerebrales, adjudicando la recuperación a liberación de factores humorales y factores neurotróficos que reactiven la función neural (Dunnet y Björklund, 1987; Piña, Ormsby y Bermúdez-Rattoni, 1994).

Respecto a la recuperación de factores humorales difusibles, tales como los neurotransmisores, se ha demostrado que rebanadas de CI *in vitro* son capaces de liberar los neurotransmisores ácido g-amino-butírico (GABA), acetilcolina y glutamato, pero no dopamina, asimismo se encontró que éstas rebanadas contenían cantidades significativas de las enzimas encargadas de la síntesis del glutamato y de la síntesis y degradación de la acetilcolina (López-García, Fernández-Ruiz, Bermúdez-Rattoni y Tapia, 1990). Al respecto, análisis bioquímicos demostraron que los transplantes de CI son capaces de liberar GABA, acetilcolina y glutamato en respuesta a una corriente despolarizante. En contraste, transplantes de corteza occipital liberaban GABA y glutamato pero no acetilcolina, correlacionándose con estudios en donde los transplantes de corteza occipital no son capaces de inducir recuperación de la conducta del CAS (Escobar et al., 1989). Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que la transmisión colinérgica es importante para el CAS y que la acetilcolina pudiera jugar un papel importante en la recuperación conductual mediada por transplantes (Piña, Ormsby, Jiménez, Tapia y Bermúdez-Rattoni, 1994).

Las implicaciones de esta serie de experimentos con trasplantes es que, para la CI, la recuperación funcional está relacionada con la maduración morfológica y la actividad colinérgica del trasplante. Se ha reportado que el factor de crecimiento neuronal (FCN) produce una regeneración y una penetración significativas de axones colinérgicos en la formación hipocampal (Gage, 1990), además de que ratas viejas, que tienen una disminución generalizada de los niveles de acetilcolina e impedimentos funcionales, que recibieron infusiones intracerebrales constantes de FCN, mejoraron drásticamente después de unas semanas de tratamiento (Gage y Björklund, 1986). En un experimento para evaluar el papel del FCN sobre la habilidad de adquisición de CAS inducida por trasplantes, varios grupos de ratas que mostraban una disrupción en la habilidad para aprender aversiones al sabor, debido a lesiones electrolíticas de la CI, fueron implantados como sigue: un grupo recibió Gelfoam (Una esponja fisiológica reabsorbible) con FCN, otro recibió trasplantes de CI fetal con FCN, un tercer grupo recibió Gelfoam con el vehículo en el que se diluiría el FCN y un grupo que recibió los trasplantes de CI fetal con vehículo. Un grupo extra fué utilizado como un control sin operación. Todos los grupos mencionados fueron divididos a su vez en tres subgrupos que fueron reentrenados en el CAS a los 15, 30 y 60 días post-trasplante, respectivamente. Los resultados conductuales mostraron que los grupos controles presentaron aversiones robustas en los tres tiempos post-trasplante. El grupo con trasplante cortical con FCN mostró una recuperación significativa en la habilidad para adquirir aversiones al sabor en los tres tiempos post-trasplante comparado con los controles. El grupo con trasplantes corticales

con vehículo (sin el FCN) no mostraron recuperación a los 15 días post-transplante, y recuperó parcialmente a los 30 días y totalmente a los 60 días. Los grupos que recibieron Gelfoam con FCN y sin el factor no mostraron recuperación alguna en ninguno de los 3 tiempos post-transplante examinados, al ser comparados con los controles. Estos resultados indican que la aplicación del factor de crecimiento neuronal acelera la habilidad de adquirir aversiones al sabor a 15 días post-transplante (Bermúdez-Rattoni et al. 1992).

Esta serie de resultados muestran claramente que la aplicación del FCN con trasplantes de corteza insular acelera la recuperación de el condicionamiento aversivo a los sabores con lesiones preadquisición. Es importante notar que estudios previos habían mostrado que en ausencia de FCN los trasplantes de CI solo comienzan a inducir recuperación hasta los 30 días después de la implantación, por lo que los efectos del FCN parecen acelerar la recuperación.

Hasta hace poco tiempo, estudios que investigaban el papel de la CI en procesos de aprendizaje y memoria se enfocaban principalmente en la representación sávida y visceral, particularmente en el CAS (Bermúdez-Rattoni, Fernández y Escobar, 1989, Lasiter y Glanzman, 1985, Garcia, Lasiter, Bermúdez-Rattoni y Deems, 1985). En una reciente serie de experimentos se examinó el efecto de lesiones de ya sea la amígdala o la corteza insular inducidas por microinyección del N-metil-D-Aspartato (NMDA) sobre la adquisición de la conducta de prevención pasiva, que consiste en la aplicación de un choque eléctrico a un animal

cuando este cruza de un compartimento claro a uno oscuro, lo que produce que el animal evite reentrar al compartimento oscuro, así como del condicionamiento aversivo a los sabores. Cabe mencionar que las lesiones inducidas por NMDA tienen la propiedad de lesionar preferencialmente los cuerpos celulares dejando la mayoría de las fibras de paso intactas (Jonsson, 1980), lo que permite que los efectos observados puedan ser atribuidos con mayor seguridad a funciones específicas del área lesionada. Los resultados mostraron que lesiones de CI, pero no lesiones de la amígdala, producían deficiencias en la adquisición del CAS. Inesperadamente los animales con lesiones de CI también eran incapaces de adquirir la respuesta de prevención pasiva, la cual, como era esperado, fué afectada por lesiones amigdalinas. Estos resultados constituyen la primera demostración de que la CI está involucrada en la mediación de la representación de memoria de estímulos extero-nociceptivos así como viscerales. Tales efectos pudieran ser mediados por conexiones recíprocas de la CI con la amígdala (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991).

Otra serie de experimentos han utilizado la técnica de lesiones reversibles mediante la aplicación de el bloqueador neural tetrodotoxina (TTX). La TTX actúa mediante el bloqueo selectivo de canales de sodio sensibles a voltaje de las neuronas, lo cual impide que haya potenciales de acción en éstas, desacoplándose del canal en unas cuantas horas, restaurando la función normal. En éstos experimentos (Bermúdez-Rattoni, Introini-Collinson y McGaugh, 1991) la TTX fué aplicada a la corteza insular, así como a otras regiones cerebrales, antes o después

del entrenamiento de prevención pasiva y del entrenamiento del laberinto de agua de Morris, en donde el animal tiene que encontrar nadando una plataforma sumergida mediante claves espaciales. Para la prevención pasiva se utilizaron ensayos repetidos de adquisición según el protocolo de McGaugh, Introvini-Collinson y Nagahara (1988). En breve, cada rata era colocada en el compartimento iluminado de un aparato con dos compartimentos divididos por una compuerta. Cuando el animal volteaba a la compuerta ésta era abierta permitiendo el paso al compartimento oscuro. Una vez que el animal había cruzado hacia el lado oscuro, la compuerta se cerraba y se aplicaba un choque eléctrico a través de placas metálicas en el piso. Este procedimiento se repetía hasta que el animal tardara un tiempo criterio en volver a cruzar. En la prueba de retención los animales se colocaron en el compartimento claro, se abría la compuerta y se registraba la latencia de cruce con un máximo de 600 segundos. Los resultados mostraron que las infusiones de TTX en la CI pre- y postentrenamiento deshabilitan la retención de las dos conductas, lo cual indica que la desactivación funcional de la CI produce amnesia retrógrada y anterógrada en dos tareas de aprendizaje motivadas aversivamente (Bermúdez-Rattoni et al 1991). Estudios posteriores han demostrado que la participación de la CI en la tarea de prevención pasiva está relacionada con los aspectos aversivos de la conducta y no con los espaciales ni motores (Ormsby, Piña, Ramírez-Amaya y Bermúdez-Rattoni, 1993).

Los injertos cerebrales también han demostrado capacidad para inducir la recuperación de la tarea de prevención pasiva. Utilizando los procedimientos

descritos, ratas con lesiones de CI recibieron transplantes con FCN o sin él y fueron entrenadas 20 días después en la tarea de prevención pasiva, encontrándose que los animales controles y los animales con implantes con FCN aprendieron la conducta obteniendo valores altos de latencia de cruce, mientras que los animales que recibieron transplantes con vehículo y los que quedaron lesionados mostraron déficits en la ejecución de la tarea, mostrado por bajas latencias (Escobar, Russell et al., en prensa).

EXPERIMENTO 1.

Objetivo.

Con el fin de probar si la corteza insular de la rata está involucrada en los procesos de memoria a largo plazo (retención o evocación) de las tareas de prevención pasiva y condicionamiento aversivo a los sabores, se realizó el siguiente experimento.

Las hipótesis se basó en la idea de que si se observa alguna alteración en la respuesta esperada debido a lesiones que se realicen después de la consolidación, debe indicar una participación de la CI en los procesos de memoria a largo plazo (post-consolidación) de la respuesta afectada.

Se utilizó un grupo que recibió lesiones de la corteza insular post-adquisición de ambas tareas con el fin de observar los efectos sobre éstas. Se incluyó un grupo control quirúrgicamente intacto que sirvió para observar los efectos conductuales que tenían las manipulaciones experimentales en el animal íntegro. Además se incluyó un grupo de lesión falsa para descartar la posibilidad de que los efectos observados fueran debidos a la sola manipulación quirúrgica y no a procesos específicos del área lesionada.

Se realizó además una prueba de reactividad al sabor, para verificar que las lesiones no estuviesen afectando la percepción sensorial de los sabores, y por tanto

los efectos observados no pùdieran atribuirse a efectos sobre la memoria al condicionamiento aversivo a los sabores.

Sujetos.

Se utilizaron dieciocho ratas macho de la cepa Wistar provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, de aproximadamente seis meses de edad y un peso de 231-256 gr. al comienzo del experimento. Todos los animales fueron albergados en cajas-habitación individuales de Plexiglass con agua corriente y comida (Purina® Roedent Lab Pellets) *ad libitum*, excepto cuando fuere indicado por el protocolo. Los animales se mantuvieron en un ciclo invertido de luz-obscuridad 12:12 hrs, en donde las manipulaciones experimentales se realizaron en la fase oscura del ciclo, que corresponde a la etapa de actividad de ésta especie (Remie, van Dongen, Rensema y van Winnik, 1990).

Materiales.

Para la tarea de prevención pasiva se utilizó una caja de acrílico transparente de 51 cms de largo, 17 cms de ancho y 20 cms de alto. La caja se encontraba dividida en dos compartimentos por una compuerta tipo guillotina; un compartimento medía 21 cms de largo con paredes y techo transparente, el

segundo compartimento medía 30 cms de largo con paredes y techo de color negro excepto por una pequeña ventana de acrílico transparente teñido de rojo, de tal manera que quedara un compartimento iluminado y otro oscuro. El aparato era iluminado indirectamente por un foco blanco de tungsteno de 40W. El piso del aparato consistía en dos placas de aluminio colocadas longitudinalmente y en ángulo con respecto al piso con una separación de 1 cm en el fondo. Las placas se encontraban conectadas a un estimulador eléctrico (Grass® Stimulator mod. S44) calibrado para descargar pulsos de 1mA de intensidad y 3 seg de duración cada uno (Figs 3a y 3b).

En la tarea del condicionamiento aversivo a los sabores se utilizaron como bebederos probetas graduadas de plástico de 50ml con tapón de hule y pipeta de metal. Las sustancias que se utilizaron fueron Cloruro de Sodio (NaCl), Cloruro de Litio (LiCl), ambos de Baker Analyzed® y Sacarina Sódica (2,3-Dihidro-3-oxobenzisulfonazol) de Sigma Chem. Co.® (fig 4).

Las lesiones se practicaron bajo anestesia inducida por pentobarbital sódico veterinario (Anestosal™) inyectado intraperitonealmente. Los animales fueron montados para su lesión en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments®) en cuya punta se fijó un electrodo consistente en una aguja entomológica de acero inoxidable de 0.7mm de ancho aislada eléctricamente excepto por 0.5mm en la punta. El electrodo se conectó al cátodo de un estimulador Grass® LesionMaker y el ánodo se conectó a una pinza tipo caimán sujetado a la dermis de la cabeza del

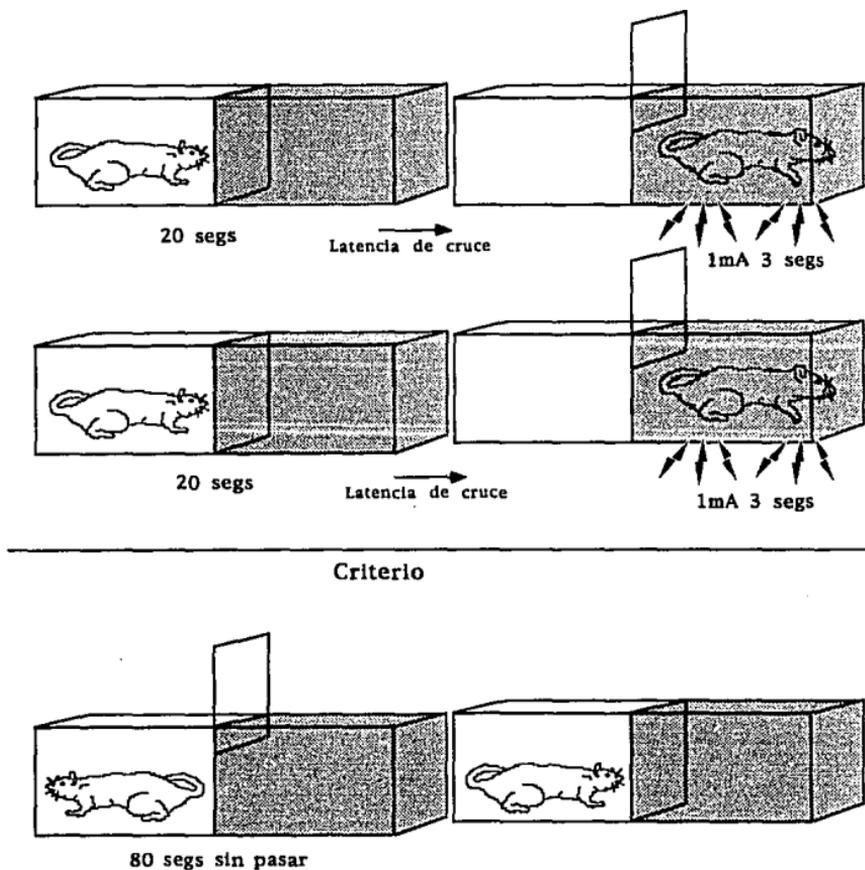


Figura 3a. Esquema del procedimiento de adquisición de la prevención pasiva.

La parte de arriba se repite cuantas veces sea necesario para que el animal tarde más de 80 segundos en volver a cruzar al lado oscuro (abajo).

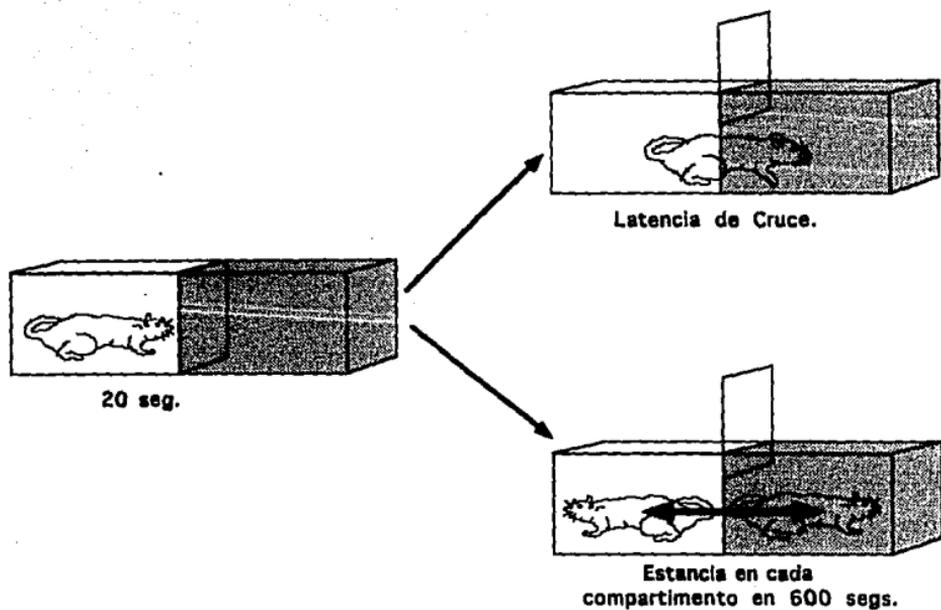


Figura 3b. Esquema de la prueba de evocación de la prevención pasiva.

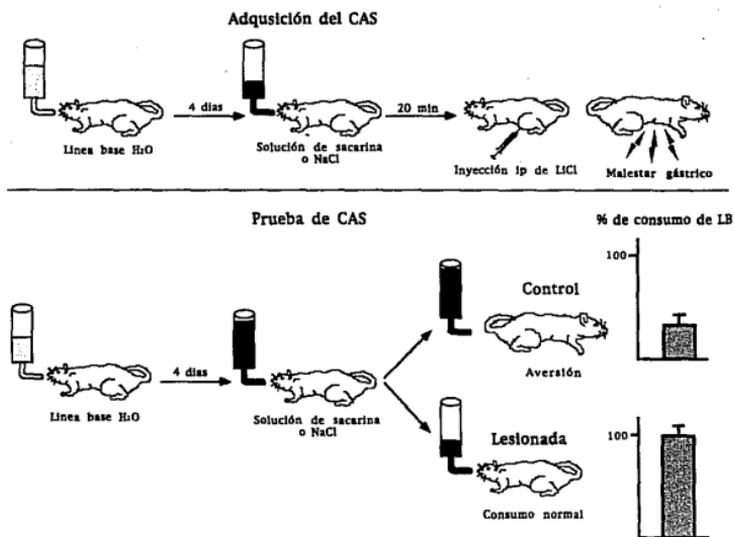


Figura 4. Diagrama del procedimiento del condicionamiento aversivo a los sabores. En la parte de arriba se describe la fase de adquisición y abajo la prueba de evocación. En la parte inferior derecha se muestra un ejemplo de resultados esperados entre lesionados y controles. A menor valor de la variable en y, mejor el desempeño.

animal. Los trépanos se realizaron con un minitaladro con punta esférica de 1.2mm de diámetro. Los procedimientos de incisión y sutura se realizaron con material quirúrgico estándar utilizando Cloruro de Benzalconio (Farmacéutica Altamirano®) al 1% como antiséptico.

El procedimiento de perfusión se llevó a cabo por medio de dos frascos de 1 litro suspendidos verticalmente a una altura de 1.5 m e invertidos y conectados a un sistema de venoclísis con una aguja B-D Yale® de 2.1mm y una válvula que permitía regular el flujo de cada uno de los frascos a través de la aguja. Un frasco contenía solución salina fisiológica (NaCl al 9%) y el otro una solución al 4% de Paraformaldehído (Baker Analyzed®) y 1% de Glutaraldehído (Merk®) diluidos en un amortiguador de pH a 7.4 compuesto de 0.1 molar de Fosfato de Sodio (NaPO₄) de Baker Analyzed®.

Procedimiento.

Una descripción esquemática del procedimiento del experimento aquí descrito se muestra en la figura 5.

Los animales fueron habituados por quince días al ciclo de luz-oscuridad, tras los cuales fueron puestos en un régimen restringido de agua que consistió en el retiro de los bebederos y de la presentación dos veces al día de las probetas graduadas con 50 ml de agua destilada. La primera presentación se realizaba a las 10:00 a.m. (primera hora de la fase oscura) y la segunda a las 5:00 p.m. (octava hora

de la fase oscura). Ambas presentaciones se realizaban en la caja-habitación de los animales por un periodo de 10 min cada una y al final se registraba el consumo con una precisión de ± 0.5 ml. Este procedimiento se repitió por 6 días obteniéndose de esta manera un valor de línea base de consumo de agua. El día siguiente a la última medición de agua, con el fin de entrenar a los animales en el condicionamiento aversivo al sabor (fig 4), en la presentación de la mañana a todos los animales se les substituyó el agua destilada por una solución al 0.1% de sacarina durante 10 min, registrando el consumo. Veinte minutos después los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una solución 0.15 molar de LiCl en una dosis de 7.5 ml/kg de peso. La inyección de la solución de LiCl produce en los animales una irritación gástrica, confirmada por una respuesta emética y una contracción abdominal inmediatamente después de la inyección (Braun, Lasiter y Kiefer, 1982). Siete horas después de la inyección se regresó a condiciones *ad libitum* de agua.

Transcurridas 48 horas a partir del entrenamiento de aversión al sabor, todos los animales fueron entrenados en la tarea de prevención pasiva (fig 3a). Esta tarea se realizó de la siguiente manera: se colocó al animal en el compartimento claro por 20 seg con la compuerta divisoria cerrada; se abrió entonces la puerta permitiendo que el animal cruzara al lado oscuro, registrando el tiempo que tardaba en cruzar. En el momento en que la rata posó las cuatro patas en el interior del compartimento oscuro, se cerró la compuerta y se le administró un choque eléctrico de 1 mA por 3 seg abriéndose después la compuerta para dejar escapar a

animal al lado claro. En caso de que el animal no escapara de inmediato al lado claro, se le aplicaría un segundo choque. Al regresar el animal al lado claro se cerraba la compuerta y se dejaba al animal por 20 seg, volviéndose a abrir la compuerta y repitiendo la operación descrita las veces que fuera necesario para que el animal no cruzara al lado oscuro durante un periodo de 80 seg, tras los cuales se cerraba la compuerta y se retiraba al animal.

Dos días después del entrenamiento de prevención pasiva (4 días después del condicionamiento aversivo al sabor) para permitir la consolidación, se dividieron a los animales en tres grupos: un grupo control (CON), que no recibió tratamiento quirúrgico alguno, pero recibió los tratamientos conductuales al igual que el resto de los animales; un grupo de lesión falsa (LESF) el cual fué sometido al procedimiento quirúrgico pero no recibió lesión; y un grupo lesionado (LES) que recibió lesiones bilaterales de la corteza insular.

Para producir las lesiones se anestesió a cada animal con una dosis de 70 mg/kg de pentobarbital sódico, se fijó la cabeza del animal al aparato estereotáxico y se le practicó una incisión longitudinal de aproximadamente 2.5 cm, se separó el tejido para descubrir el cráneo y la punta del electrodo se posicionó sobre el punto bregma. A partir de las coordenadas de este punto se posicionó el electrodo 1.2 mm rostralmente en el plano anteroposterior y 5.5 mm hacia el lado derecho, haciendo una marca que sirvió de guía para la realización de un trépano hasta la superficie de la duramadre. El electrodo se posicionó sobre la duramadre en este

punto y se insertó 5.5 mm verticalmente en el plano dorsoventral. Mediante este procedimiento la punta del electrodo quedó posicionado en el centro de la corteza insular agranular (Paxinos y Watson, 1980). Se indujo una lesión mediante una corriente catódica de 8 mA por 45 seg, dejando el electrodo en esa posición por otros 60 seg. Se retiró el electrodo y se repitió este procedimiento para el lado izquierdo, de tal manera que quedara lesionada bilateralmente la estructura. Se cerró entonces la herida mediante tres o cuatro puntos de sutura no reabsorbible. El grupo de lesión falsa recibió el tratamiento descrito a excepción de la aplicación de la corriente, por lo que no se produjo lesión.

Trancurridos ocho días para permitir una recuperación post-operatoria, todos los animales fueron sometidos a la prueba de retención de la prevención pasiva (fig 3b), la cual consistió en poner a cada animal en el compartimento claro durante 20 seg tras los cuales se abrió la compuerta y se registró el tiempo que el animal tomaba para cruzar al lado oscuro (latencia) y durante 600 seg se midió el tiempo acumulado que el animal permaneció en el lado claro. Al siguiente día se comenzó el régimen restringido de agua descrito con el fin de obtener una nueva línea base de consumo. Cuatro días después se les presentó a los animales en la sesión de la mañana en su bebedero la solución de sacarina con el fin de realizar la prueba de retención del condicionamiento aversivo al sabor, registrando su consumo (fig 4). En este caso se les siguió manteniendo a todos los animales en el régimen restringido de agua para la prueba de sensibilidad al sabor. Una vez alcanzado la tercera línea base de consumo de agua (4 días) se substituyó el agua

de la sesión matutina por una solución de NaCl al 0.15 molar, la cual se ha reportado produce un incremento en el consumo de ratas intactas y sin experiencia a ese sabor (Braun, Lasiter y Kiefer, 1982).

Dos días después, todos los animales excepto el grupo CON fueron sometidos a un procedimiento de perfusión con el fin de remover los cerebros para su examen histológico. Los animales fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico, abriéndoseles la cavidad torácica inmediatamente después del paro respiratorio con el fin de exponer el corazón. Con una pinza hemostática se cortó la circulación de la vena cava descendente y se insertó la aguja de perfusión en el ventrículo izquierdo y se realizó una incisión en la aurícula derecha, se permitió el flujo entonces de la solución salina hasta que sustituyera al fluido sanguíneo en toda la región de la cabeza cambiándose entonces el flujo por la solución fijadora de paraformaldehído. Esta última solución tiene la función de fijar la membrana celular para impedir que cambios osmóticos fuertes debidos a manipulaciones histológicas destruyan a las células. Una vez sustituida la solución de salina por la de paraformaldehído se procedió a remover el cerebro completo manteniéndose en fijador por 24 hrs cambiándose después por una solución al 20% de sacarosa en amortiguador de fosfato de sodio por 3 días. Los cerebros fueron cortados en un microtomo de congelación en cortes de 40 micras, colocados serialmente en dos conjuntos de portaobjetos tratados con gelatina purificada. Un conjunto de portaobjetos fué teñido con tinción de Nissl (violeta de cresilo) y el otro con tinción histoquímica para la enzima Acetil-colinesterasa. Ambas tinciones

Grupos

Día	Control	Lesión Falsa	Lesión
0	Entrenamiento de CAS a sacarina		
2 (+2)	Entrenamiento de Prevención Pasiva		
4 (+2)	Inserción del electrodo en la CI sin corriente.		Lesión bilateral electrolítica de la CI.
12 (+8)	Prueba de Prevención Pasiva		
16 (+4)	Prueba de CAS a sacarina		
20 (+4)	Presentación de la solución de NaCl		
22 (+2)	Perfusión de los cerebros		

Figura 5. Esquema del procedimiento utilizado en el Experimento 1. Los números entre paréntesis en la columna de Día indican los días transcurridos desde la condición inmediatamente anterior.

se realizaron con un procedimiento modificado de Paxinos y Watson (1980). Los cortes fueron cubiertos con resina sintética Permount® y observados en microscopio de luz para asentar la localización anatómica de las lesiones.

Resultados:

En la prueba de prevención pasiva, se utilizó un análisis estadístico de tipo no paramétrico, dado que la latencia y la estancia máxima que pudiera tener un animal fué cortado arbitrariamente en 600 seg, lo cual convierte a éstos datos en ordinales, ya que los datos de 600seg no corresponden a un intervalo definido, sino que representan en realidad "más de 600"; Las características de este diseño permiten un análisis por medio de la prueba de Kruskal-Wallis para efectos de grupo en la condición, y comparaciones *post hoc* entre grupos utilizando la prueba estadística de la U de Mann-Whitney (Siegel y Castellan, 1988).

La medición de la latencia de cruce al lado oscuro (fig 6) mostró que tanto el grupo control (CON, n=7) como el de lesión falsa (LESF, n=4) tuvieron una latencia alta (CON $X = 61.07$ seg, $s = \pm 35.87$; LESF $X = 77.86$, $s = \pm 37.98$), lo que indica retención de la tarea, mientras que el grupo lesionado (LES, n=7) mostró una muy baja latencia de cruce ($X = 10.67$, $s = \pm 4.2$). El análisis estadístico mostro que existía un efecto significativo de grupo ($H(3,16) = 10.12$, $p < 0.01$) y en particular se encontró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CON y el lesionado

($U_{(17)} = 10, '42$, $p < 0.01$) y entre el grupo de lesión falsa y el lesionado ($U_{(17)} = 9, '38$, $p < 0.05$).

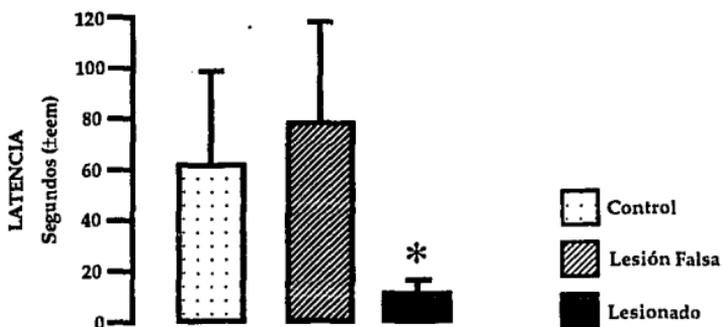


Figura 6. Resultados de la latencia de cruce en la prueba de evocación de la prevención pasiva. (eem) error estándar de la media. * $p < 0.05$ con respecto al control.

En la fig 7 se muestran los resultados de la estancia en ambos lados de la caja de prevención pasiva. Para fines del análisis estadístico solo se tomó en cuenta el valor de la estancia en el lado claro (ELC), sin embargo si el análisis se hubiese realizado sobre la estancia en el lado oscuro (ELO) las diferencias estadísticas encontradas hubiesen sido idénticas dado que $ELO = 600 - ELC$; y $ELC = 600 - ELO$, por lo que las diferencias entre grupos se hubiesen mantenido. En ésta medición se encontró que el grupo CON y el de lesión falsa tuvieron una mayor estancia en el lado claro (CON, $X = 377.10\text{seg}$, $s = \pm 52.62$; LESF, $X = 355.17\text{seg}$, $s = \pm 110.34$), mientras que el grupo lesionado tuvo una preferencia por el lado

oscuro (LES, $X = 174.71$ seg de estancia en lado claro, $s = \pm 57.47$). El análisis estadístico mostró un efecto significativo de diferencia entre grupos ($H(17) = 9,92$, $p < 0.01$), la cual fué producida por una diferencia significativa entre el grupo control y el lesionado (CON vs. LES, $U(17) = 11, '39$, $p < 0.01$) y adicionalmente entre el grupo LES y de LESF ($U(17) = 10, '40$, $p < 0.05$).

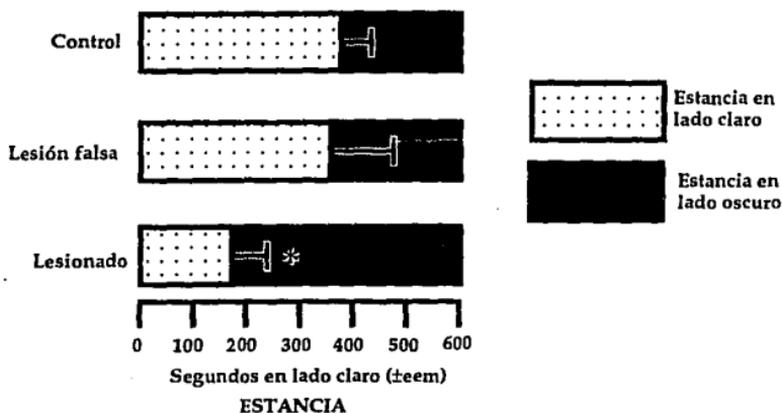


Figura 7. Resultados de la estancia en cada lado en 600 segundos. Para fines estadísticos solo se utilizó la estancia en el lado claro. (eem) error estándar de la media. * $p < 0.01$ con respecto al control.

En la prueba del condicionamiento aversivo a los sabores el valor del consumo de la solución de sacarina fué transformado a un valor de porcentaje de consumo de línea base de agua; esto es, los valores de consumo de agua en las dos mañanas precedentes fueron promediados aritméticamente para cada animal y este valor considerado como 100% y comparado con el consumo de la solución de

sacarina el día de la prueba arroja un valor porcentual de consumo de sacarina en comparación al consumo de agua. Esta transformación se realiza dado que los animales con lesión de la corteza insular presentan una pequeña, pero significativa, reducción en el volumen de consumo general (Braun, Lasiter y Kiefer, 1982) y de ésta manera se elimina la posibilidad de que las diferencias que se pudieran observar entre controles y experimentales fueran debidas a este fenómeno (Dugas de Villard, Her y McLeod, 1981).

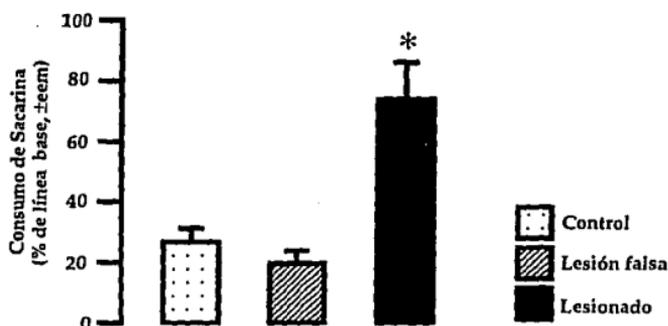


Figura 8. Resultados de la prueba de condicionamiento aversivo a los sabores. El porcentaje de línea base se obtuvo tomando como 100% la media aritmética del consumo de las dos mañanas precedentes a la presentación del sabor (sacarina). (eem) error estándar de la media. * $p < 0.01$ con respecto al control.

Los resultados obtenidos de la transformación descrita arriba fueron analizados entonces mediante una prueba estadística de ANOVA simple con comparaciones individuales *post hoc* de Fisher. El consumo de sacarina el día de la

adquisición fué similar en los tres grupos (CON, $X=23.25$ ml, $s=\pm 3.23$; LESF, $X=24.5$ ml, $s=\pm 5.16$; LES, $X=22.75$ ml, $s=\pm 4.33$) y similar a su vez con el consumo de línea base de agua. El día de la prueba (Fig 8) el grupo control (CON) y de lesión falsa (LESF) mostraron un porcentaje reducido de consumo de sacarina, indicando una aversión condicionada ($X=26.85\%$, $s=\pm 4.28$ y $X=19.43\%$, $s=\pm 3.43$; respectivamente), en cambio, el grupo de lesión en la corteza insular (LES) presentó un consumo de sacarina más similar al consumo de agua previo ($X=73.71\%$, $s=\pm 11.43$) indicando una aversión disminuida. Se encontró una diferencia significativa en el efecto de grupo del ANOVA ($F=11$, $p<0.01$) y análisis de Fisher posteriores mostraron que el efecto era debido a una diferencia significativa ($DMS= 45$, $p<0.01$) entre el grupo lesionado y el control, pero no entre el grupo CON y el de LESF, lo que indica que los animales LES presentan una deficiencia significativa en la respuesta de aversión condicionada al sabor.

En la prueba de reactividad al sabor de salina (Fig 9) no se aplicó la transformación a porcentaje, dado que la comparación se realizó intragrupo y no intergrupo como en el caso anterior, y se utilizaron las mismas pruebas estadísticas descritas. Durante la línea base de consumo de agua se observó que los animales lesionados presentaron un consumo bajo ($X=14.55$ ml, $s=\pm 0.88$) comparado con los controles (CON $X=17.35$ ml, $s=\pm 1.02$; y LESF $X=16.85$ ml, $s=\pm 0.93$) con una diferencia significativa ($F=13$, $p<0.05$) de efecto de grupo, y específica entre CON y LES de $p<0.05$ ($DMS=2$). El día de la presentación de la solución salina se observó un incremento en el consumo de todos los grupos con respecto a los valores de

línea base de agua (CON X=20.55 ml, s=±1.23; LESF X=18.05 ml, s=±1.13; y LES X=18.35 ml, s=±1.39) con diferencias significativas de efecto de condición (F=13, p<0.01), específicamente entre línea base de agua y consumo de salina en los grupos CON (p<0.05) y LES (p<0.01). Esto indica que tanto los animales lesionados como los controles presentaron un aumento significativo en su consumo al presentarse la solución salina.

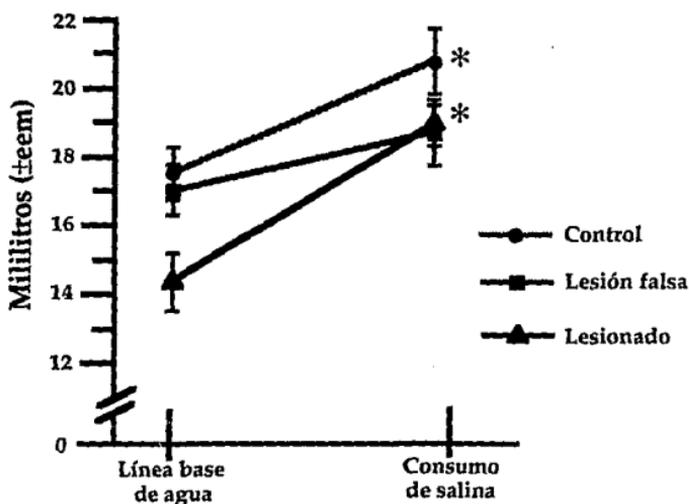


Figura 9. Resultados de la prueba de reactividad al sabor. Los valores de línea base se obtuvieron de la media aritmética del consumo de agua de las dos mañanas precedentes. (eem) error estándar de la media. * p<0.05 con respecto a la línea base respectiva.

La revisión histológica mostró que las lesiones abarcaron la mayor parte de la corteza insular y en algunos casos la lesión incluyó también a la corteza piriforme y al claustrum. La histoquímica para la Acetilcolinesterasa mostró que en una pequeña área alrededor de la lesión se encontraba disminuída la presencia de ésta enzima. Esto probablemente debido a la aparición de la glía reactiva, característica de todas las lesiones. En los animales de lesión falsa sólo se observó una pequeña línea vertical de daño, causada por la entrada del electrodo, pero la región de la corteza insular se encontró intacta. (fig 10).

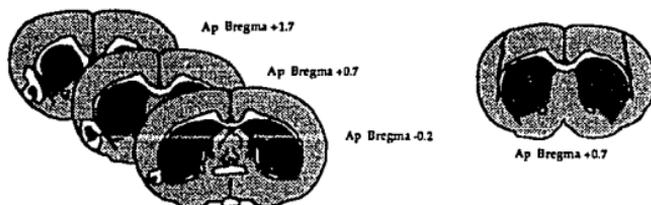


Figura 10. Diagrama de la ubicación de las lesiones, en cortes coronales que incluyen a la corteza insular. De lado izquierdo se muestra la lesión mayor (área ashurada) y la menor (área negra) que se observó. En el lado derecho se muestra un ejemplo de los vestigios de la inserción del electrodo en una ratona de lesión falsa. Se indica a la derecha de cada corte su ubicación anteroposterior con respecto al punto bregma.

Discusión.

Los resultados que aparecen en las figuras 6 y 7, muestran que hay un claro efecto de las lesiones de corteza insular sobre la memoria a largo plazo de la prevención pasiva. Tanto los animales controles como los de lesión falsa mostraron una alta latencia de cruce al lado oscuro, mientras que los animales lesionados cruzaron de una manera rápida. También se mostró este efecto con la medición de la preferencia que cada animal tenía por cada compartimento, mostrado por su estancia. De ésta manera los animales controles y de lesión falsa pasaron más tiempo sumado en el lado claro (compartimento de seguridad) y los lesionados pasaron mayor tiempo en el lado oscuro (compartimento de castigo). El fenómeno de preferencia por la obscuridad es normal dado que esta especie tiende a ser fotofóbica, por lo que la conducta de los animales lesionados puede ser considerado como "instintiva" o no condicionada y la de los controles como una conducta aprendida.

En el caso del condicionamiento aversivo a los sabores, también se pudo observar un efecto negativo de las lesiones sobre la memoria a largo plazo. Los animales controles y de lesión falsa ingirieron poca cantidad de la solución de prueba (sacarina) relativa a su línea base de consumo de agua. Los animales lesionados no mostraron una baja significativa en su consumo, por lo que es de suponerse que las lesiones impiden la realización normal de la conducta. En éste caso, cabría la posibilidad de que los animales bebieran su consumo de línea base

normal al presentarse el sabor de prueba, si no fuesen capaces de discriminar entre el sabor del agua y el de la sacarina, esto es, la posibilidad de que fuese solo un déficit sensorial y no uno de memoria. Para estudiar este efecto se realizó la tercera parte del protocolo.

Las lesiones de CI no parecen tener un efecto sobre la discriminación del sabor que se demuestra por la presentación de la solución salina sin condicionamiento (fig 9), lo cual produjo tanto en controles y lesionados un incremento significativo en el consumo con respecto a su consumo previo, indicando una percepción adecuada del sabor. En esta prueba particular el grupo de lesión falsa presentó un incremento más pequeño y no estadísticamente significativo, lo cual puede ser adjudicado al bajo número de sujetos en éste grupo; sin embargo, se pudo probar que éstos animales también tenían una percepción normal al sabor dado que sí presentaron un condicionamiento aversivo al sabor de sacarina (ver fig 8). La suposición implícita en éste diseño de que una percepción normal del gusto a una solución salina es generalizable a la percepción del gusto dulce y amargo (sacarina) se basa en el hecho de que el sustrato neuronal para todos los tipos de sabores es el mismo (Patton, 1950), teniendo que la única diferencia radica en los quimiorreceptores en la lengua, los cuales permanecen intactos en los animales lesionados, de tal manera que si existiese una alteración en la percepción del sabor debido a daños neurales y no de los receptores, esta sería en los cuatro tipos de sabores por igual. En el caso de la prevención pasiva, experimentos previos en nuestro laboratorio (Ormsby, Piña, Ramírez-Amaya y

Bermúdez-Rattoni, 1993) mostraron que los animales con lesión electrofónica de la CI, al igual que ratas control, eran capaces de aprender una tarea de condicionamiento de lugar en el mismo aparato utilizado en éste experimento, si se utilizaban reforzadores positivos en lugar de choques eléctricos; lo cual demuestra que los animales lesionados no tienen deficiencias motoras o atencivas que les impidan el aprendizaje de la prevención pasiva, por lo que se adjudica la deficiencia a problemas de aprendizaje y memoria.

Finalmente es importante notar que dentro de la metodología aquí presentada, se introdujo en la sesión prueba de la prevención pasiva la medición de estancia en cada uno de los compartimentos en 600seg, encontrándose que los controles tienen una estancia mayor en el lado claro a diferencia de los animales lesionados que prefieren el lado oscuro. Este resultado está correlacionado con la latencia de cruce medida, que ha sido en la literatura, al menos de nuestro conocimiento, la única variable medida en ésta prueba en particular. De ésta manera se propone que también la estancia en cada compartimento puede ser una variable dependiente que arroje datos importantes sobre la ejecución de los animales en ésta prueba.

EXPERIMENTO 2.

Objetivo.

Se realizó el siguiente experimento con el fin de observar los efectos que tienen los injertos de tejido fetal cerebral suplementados con factor de crecimiento neuronal (FCN) sobre la capacidad de evocación del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), en ratas con deficiencias en esta respuesta debido a lesiones post-consolidación de la corteza insular(CI).

La hipótesis se basó en la idea de que si los injertos fetales de CI podían recuperar la capacidad de evocar la respuesta del CAS adquirido previamente a la lesión de la CI.

Sujetos.

Se utilizaron 43 ratas Wistar en las mismas condiciones y características que en el experimento 1, con un peso entre 258-319 grs al comienzo del experimento. Para la obtención del tejido fetal a transplantar, se utilizaron 2 ratas Wistar hembra del mismo bioterio que los demás animales, preñadas con 15 días de gestación. el día del injerto.

Materiales.

Los materiales utilizados para el condicionamiento aversivo a los sabores son los descritos en la sección de materiales del experimento 1. Para producir las lesiones se utilizó una solución de $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la neurotoxina Acido N-metil-D-Aspártico (NMDA, Sigma Chem. Co.) diluido en un amortiguador estéril de fosfatos de sodio al 0.1M con pH de 7.4. Se utilizó para la inyección de la neurotoxina en la región cerebral a lesionar, una aguja dental de acero inoxidable (B-D Plastik) con diámetro de 30Ga (0.47mm) conectado por medio de una manguera de polietileno (Intramedic®, Clay Adams) tamaño PE-10 (diámetro interno 0.79mm, aprox.) a una microjeringa Hamilton de $10\mu\text{l}$ montada en un microinyector automático (Sage Instruments) ajustado para suministrar $0.4\mu\text{l}/\text{min}$. Todo el sistema fué purgado de aire con vehículo de solución salina fisiológica, sustituyendo la última porción del sistema (aguja dental y aproximadamente 15cm de manguera) con la neurotoxina, dejando una pequeña burbuja de aire entre el vehículo y la neurotoxina, lo cual permite que no se mezclen éstos, además de permitir ver el avance de la solución y cerciorarse así de que la aguja no se encontrara obstruída. Los implantes de tejido fetal fueron disecados e inyectados en un Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés), que es un medio mínimo que permite la supervivencia de células en cultivo o suspensión, incluyendo neuronas (Brewer, Torricelli, Evege y Price, 1993). En ésta solución se diluyó el Factor de Crecimiento Neuronal (FCN) en una proporción de $10\mu\text{g}/\text{ml}$, que es 10 veces la concentración necesaria para inducir supervivencia

neural en cultivo así como neurogenesis en células PC-12, que son células tumorales de médula suprarrenal (derivada del tubo neural embrional) que proyectan neuritas en presencia de este factor. Se decidió utilizar ésta concentración dado que en modelos *in vivo* se requiere de una mucho mayor concentración debido a la difusión (Escobar, Jiménez, López-García, Tapia y Bermúdez-Rattoni, en prensa). Dos grupos de animales recibieron implantes de Gelfoam (Upjohn), que es una esponja fisioestática de origen proteico que es utilizado en la clínica como sustento a tejido lesionado, absorbiendo el medio circundante y liberando su contenido. Otros trabajos han mostrado que la implantación de este material embebido en soluciones de FCN son capaces de inducir recuperación anatómica y funcional en preparaciones de septum e hipocampo (Hefti, 1986). Las lesiones y los injertos se realizaron estereotáxicamente utilizando material quirúrgico común en los adultos y material de microcirugía bajo un estereoscópio Zeiss en los fetos.

Procedimiento.

Se ha reportado que injertos de CI fetal suplementados con FCN son capaces de inducir recuperación de la capacidad de adquisición del CAS a los 15 días post-injerto (Escobar et al., 1989). Se intentó probar si estos injertos capaces de recuperar la adquisición también son capaces de recuperar la evocación de la respuesta. Se utilizaron animales con lesión post-consolidación y se les injertó CI fetal

suplementado con FCN. Un grupo recibió CI fetal sin FCN para observar el posible efecto del FCN sobre los injertos. Otro grupo recibió Gelfoam con FCN para observar si es el factor sólo el que indujera alguna recuperación, y un grupo con Gelfoam con vehículo como control de lesiones y manipulaciones quirúrgicas. Todos éstos grupos se compararon con un grupo control intacto para notar los efectos relativos que se pudieran observar.

Todos los grupos fueron entrenados posteriormente en un CAS a un sabor distinto con el fin de observar la funcionalidad de los implantes sobre la adquisición y poder comparar los resultados con los obtenidos en la evocación.

Un esquema del procedimiento aquí descrito aparece en la figura 11. Todos los animales fueron privados de agua por 24 hrs midiéndose una línea base de consumo como se ha descrito en el experimento anterior. Al alcanzar la línea base fueron entrenados todos los animales para el condicionamiento aversivo al sabor de sacarina, mediante la sustitución de la presentación matutina de agua por una solución de sacarina seguido 20 min después por una inyección intraperitoneal de solución de LiCl (que produce un malestar gástrico). Cuatro días después (para permitir la consolidación) todos los animales, excepto un grupo control (CON), fueron lesionados bilateralmente en la corteza insular mediante la infusión de 0.8µl de la solución neurotóxica de NMDA en las coordenadas estereotáxicas: anteroposterior +1.2mm, lateral ± 5.5 mm, dorsoventral -5.5mm y la barra de

Grupos

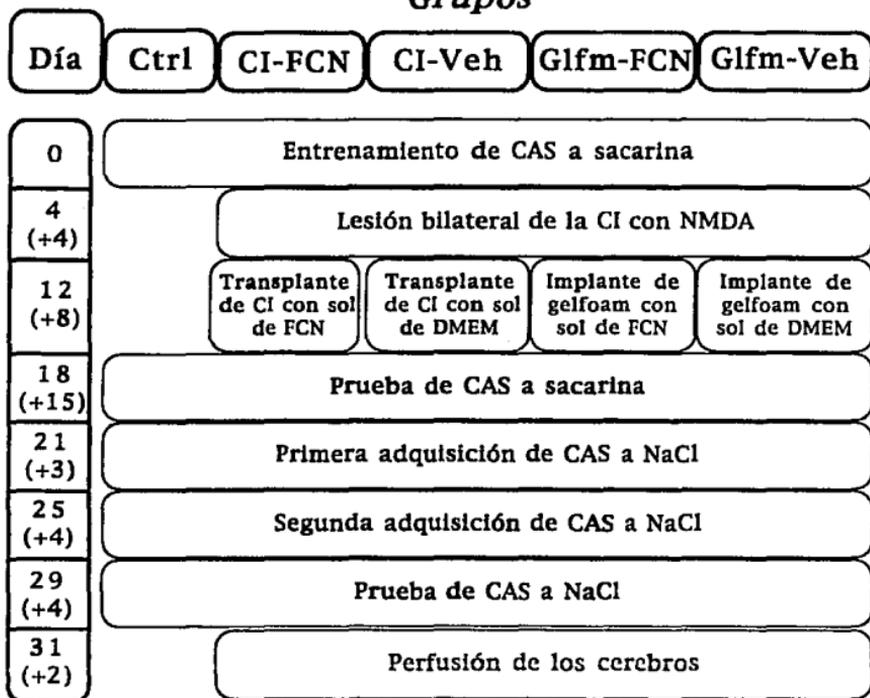


Figura 11. Esquema del procedimiento utilizado en el Experimento 2. Los números entre paréntesis en la columna de Día indican los días transcurridos desde la condición inmediatamente anterior.

incisivos a -5.0mm. La aguja se introdujo a través de un trépano realizado como se describe en el procedimiento del Experimento 1 en las coordenadas anteroposteriores y laterales antes descritas y se dejó la aguja en la posición de la lesión por 3 min más después de lesionar, con el fin de permitir la difusión de la solución, y evitar así que la sustancia tendiera a regresar por el zurco dejado por la aguja. Los animales fueron entonces suturados. Ocho días después de la lesión se procedió a practicar la implantación. Los animales lesionados fueron aleatoriamente divididos en cuatro grupos, uno que recibió implantes de corteza insular fetal en la zona lesionada, embebidos en solución de DMEM con el FCN diluído (grupo CI-FCN). Otro grupo recibió implantes de CI fetal en el área lesionada embebidos solo en el DMEM sin FCN (grupo CI-Veh), un tercer grupo al que se le implantaron piezas de 3 X 2 X 2mm de Gelfoam embebidos en el vehículo (DMEM) con FCN diluído (grupo Glfm-FCN) y un cuarto grupo al que se le implantaron las piezas de Gelfoam embebidas solo en el vehículo sin FCN (grupo Glfm-Veh).

Los injertos de corteza insular fetal se realizaron de la siguiente manera: Se anestesió con pentobarbital sódico a una rata preñada con 15 días de gestación, abriendo la cavidad abdominal y localizando a los fetos. Se procedió entonces a realizar una pequeña incisión en el útero en alguna de las regiones más aledañas a los ovarios con el fin de retirar al feto con el saco amniótico y su respectiva placenta intactos. Se retiró entonces al feto del saco y se removió toda la región cefálica colocándose en una caja de Petri llena a la mitad con el DMEM con o sin

FCN (según correspondiera) disecándose el cerebro bajo el estereoscópio retirando el cartílago craneal y las meninges. Se cortó con microtijeras de Vannas la región correspondiente a la CI del cerebro fetal (ver fig 12), utilizando como referencia la arteria cerebral media, cortando aproximadamente 1.5mm rostral y caudalmente a ésta, y 1mm ventral y dorsalmente al punto medio de ésta arteria y separando la corteza del cuerpo estriado, quedando una pieza de tejido de aproximadamente 3 X 2 X 2mm. El tejido fué entonces succionado junto con 6 a 10 µl de vehículo en una microjeringa Hamilton de 100µl. La punta de la microjeringa se posicionó en las coordenadas estereotáxicas antes descritas de una rata lesionada, previamente anestesiada y montada en el aparato estereotáxico. Se inyectó entonces la mezcla de vehículo (con o sin FCN) y tejido en un volumen de 6-10 µl, dejando la aguja en esa posición por 10 min. Este procedimiento se repitió dos veces por cada animal para que hubiese una implantación bilateral. La implantación de Gelfoam se realizó mediante la colocación de la pieza por unos segundos dentro del vehículo (DMEM) con o sin FCN, según correspondiera; la pieza se colocaba entonces en el trépano y era empujada hacia abajo por medio de una varilla de acero inoxidable de 1mm de ancho y con una marca que permitía bajarla hasta la coordenada dorsoventral requerida.

Después de la implantación se dejaron a los animales en recuperación por 12 días, después de los cuales se comenzó a medir por segunda ocasión la línea base de consumo de agua y tres días después, el día 15 post-implantación, a todos los animales se les realizó la prueba de retención del CAS a sacarina, sustituyendo el

agua por una solución de sacarina en la sesión matutina y midiendo el consumo, terminando así la fase de prueba de evocación de CAS entrenado pre-lesión y pre-implante. Se procedió entonces a la fase de entrenamiento post-implante. Se continuó midiendo por otros tres días la línea base de consumo de agua y al día 19 post-implante se entrenaron a todos los animales en un condicionamiento aversivo al sabor de salina, sustituyendo por ésta solución en la sesión matutina de ese día e inyectando 20 min después la solución de LiCl. Se continuó la medición de la línea base de consumo de agua por dos días más y al tercero se les presentó a los animales la solución de salina en sus bebederos para la prueba de retención. Durante la prueba se presentó una falla en el sistema de regulación de la temperatura del bioterio donde habitaban los animales por lo que éstos consumieron más líquido que el normal, debido a la alta temperatura; tomando en cuenta éste hecho, y dado que los animales controles presentaron un consumo evidentemente muy inferior a todos los otros grupos, se decidió inyectar a todos los animales con la solución de LiCl 20 min después de la prueba, de tal manera que ésta constituyera una segunda adquisición de aversión condicionada a la salina. Por dos días más se continuó la línea base de agua y la segunda prueba a la salina se realizó el tercer día (25 días post-transplante).

Al término de las pruebas conductuales todos los animales experimentales fueron perfundidos y sus cerebros removidos para análisis histológico, siguiendo los métodos descritos en la sección de procedimiento del Experimento 1. Se realizaron además dibujos del contorno de los implantes en esquemas de los cortes

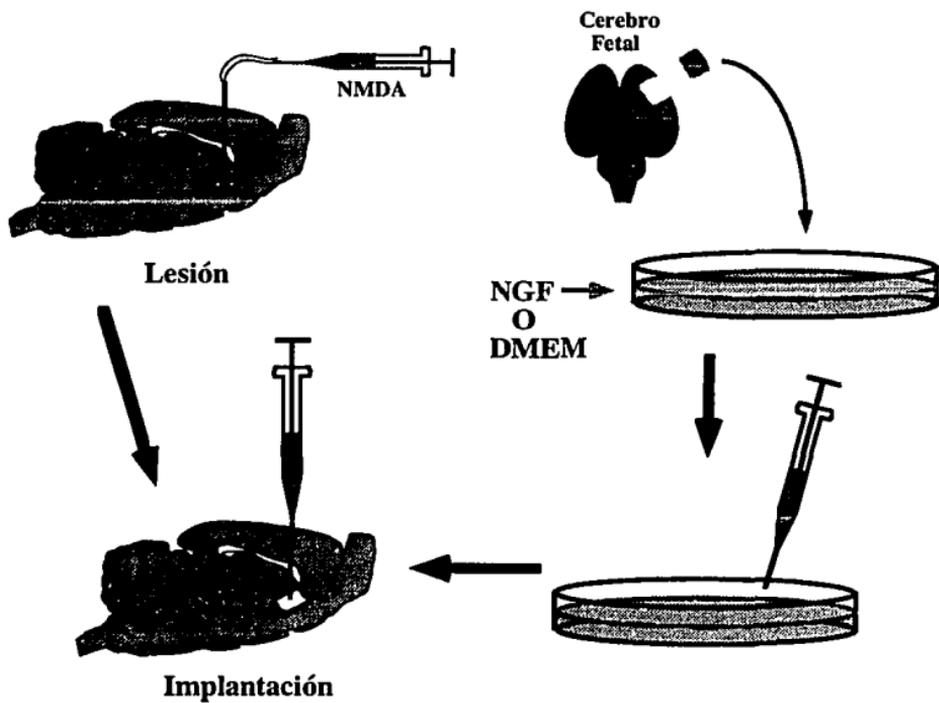


Figura 12. Esquema del procedimiento de implantación del tejido fetal.

histológicos mediante la técnica microscópica de cámara lúcida. En ésta técnica al microscopio se le adapta un periscopio que permite que simultáneamente se observe a través de los objetivos la muestra en el portaobjetos y una superficie de la mesa sobre la cual esté el microscopio, por lo que se pueden hacer coincidir en la imagen la muestra y un esquema de ésta, y dibujar siguiendo las líneas y puntos que se observen.

Resultados.

Los valores de las líneas base de consumo de agua antes de la primera adquisición fueron muy similares para todos los grupos, así como el consumo de sacarina durante la adquisición (XLB= 14.85ml, XAdq= 16.07ml; para todos los animales) lo que fué de esperarse dado que todavía no se habían aplicado condiciones experimentales diferentes.

Los resultados de la prueba de retención del CAS a sacarina se muestran en la figura 13. Como en el Experimento 1, los valores de consumo se convirtieron a un porcentaje aritmético del consumo de línea base. El grupo control (CON, n=10) presentó una aversión a la sacarina, mostrado por el bajo porcentaje de consumo con respecto a la línea base ($X= 20.41\%$, $s= \pm 4.64$). Se observó que existía una diferencia estadísticamente significativa por efecto entre grupos ($F(5, 43)= 5.67$, $p<0.05$). En el análisis *post hoc* de Fisher, el efecto entre grupos se pudo atribuir de la siguiente manera: Los grupos con injertos de CI fetal con (CI-FCN, n=8) y sin

(CI-Veh, n=8) el Factor de Crecimiento Neuronal similarmente mostraron una aversión a la sacarina (CI-FCN, X= 26.87%, s= \pm 9.86; CI-Veh, X= 28.08%, s= \pm 5.46), ligeramente menor a los controles, pero no estadísticamente significativa (CI-FCN, Diferencia Media (DM)= 6.46, Diferencia Crítica (DC)= 24.05; CI-Veh, DM= 7.67, DC= 24.05). Los dos grupos con implantes de Gelfoam con (Glfm-FCN, n=7) o sin (Glfm-Veh, n=10) el Factor de Crecimiento Neuronal mostraron una pequeña aversión en promedio (Glfm-FCN X= 51.16%, s= \pm 13.73; Glfm-Veh X= 52.31, s= \pm 8.74) pero con diferencias significativas con el control (Glfm-FCN vs. CON, $p < 0.01$; Glfm-Veh vs. CON, $p < 0.01$). Adicionalmente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con trasplante fetal y los que tenían implante de Gelfoam con vehículo (CI-FCN vs. Glfm-Veh, $p < 0.05$; CI-Veh vs. Glfm-Veh, $p < 0.05$).

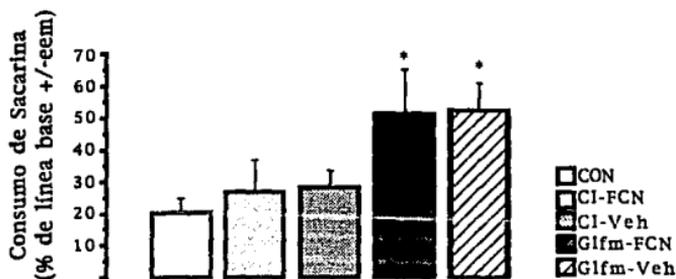


Figura 13. Resultados de la prueba de evocación del condicionamiento aversivo al sabor de sacarina. El porcentaje de línea base se obtuvo tomando como 100% la media aritmética del consumo de las dos mañanas precedentes a la presentación del sabor (sacarina). (eem) error estándar de la media. * $p < 0.01$ con respecto al control.

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

En la línea base de consumo que siguió a esta prueba, no se encontraron diferencias entre los grupos ($X = 16.19\text{ml}$, $s = \pm 1.01$, $F(5, 43) = 0.234$, para todos los animales en conjunto). El día de la adquisición a salina todos los animales mostraron un incremento en su consumo con respecto a la línea base de consumo de agua, encontrándose diferencias significativas en un análisis de varianza de repetidas medidas en el efecto de condición ($F(5, 43) = 6.48$, $p < 0.05$), pero no hubo diferencias por efecto de grupo ($F(5, 43) = 0.127$). El análisis *post hoc* mostró que el efecto de condición era debido a todos los grupos (CON $p < 0.01$, CI-FCN $p < 0.05$, CI-Veh $p < 0.01$, Glfm-FCN $p < 0.01$, Glfm-FCN $p < 0.05$). En la primera prueba de retención a salina (fig 14), el grupo CON mostró una aversión moderada hacia el sabor ($X = 40.94\%$, $s = \pm 4.36$), mientras que los demás grupos, excepto el CI-FCN, presentaron un notorio incremento en su consumo (CI-Veh, $X = 143.41\%$, $s = \pm 7.24$; Glfm-FCN, $X = 134.97\%$, $s = \pm 20.44$; Glfm-Veh, $X = 136.24\%$, $s = \pm 9.97$); el grupo CI-FCN consumió un valor similar a su consumo de línea base ($X = 99.5\%$, $s = \pm 8.56$). Todos los grupos presentaron diferencias significativas con los controles ($F(5, 43) = 10.23$, $p < 0.001$; todas las comparaciones *post hoc* contra el control, $p < 0.001$). Adicionalmente se encontraron diferencias significativas entre el grupo que recibió implantes de CI fetal con el FCN contra los otros tres grupos que recibieron injertos (CI-FCN vs. CI-Veh, $p < 0.01$; CI-FCN vs. Glfm-FCN, $p < 0.05$; CI-FCN vs. Glfm-Veh, $p < 0.05$).

Durante la segunda prueba de retención de salina (fig 14) no se encontraron diferencias significativas en la línea base de consumo de agua ($F(5, 43) = 1.823$). El

consumo de la salina mostró que el grupo control tenía una robusta aversión al sabor ($X= 17.82\%$, $s= \pm 1.21$); el grupo de injertos de CI fetal con el FCN también mostró una aversión, aunque no tan marcada ($X= 34.72\%$, $s= \pm 10.93$); y los otros tres grupos no mostraron aversión, aunque sí un pequeño decremento en su consumo (CI-Veh, $X= 83.0\%$, $s= \pm 12.08$; Glfm-FCN, $X= 79.99\%$, $s= \pm 11.87$; Glfm-Veh, $X= 71.13\%$, $s= \pm 12.39$). El análisis de varianza mostró que existía una diferencia entre grupos ($F(5, 43)= 8.98$, $p<0.001$), y el análisis *post hoc* indicó que se presentaban diferencias entre el grupo control y todos los demás grupos, excepto

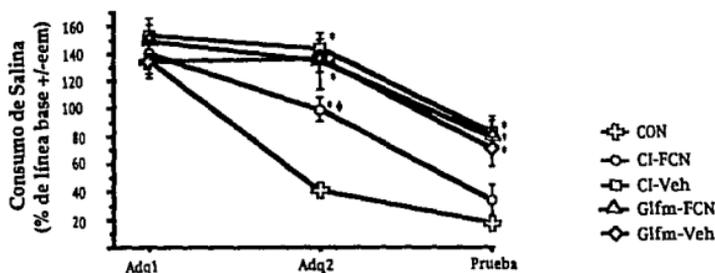


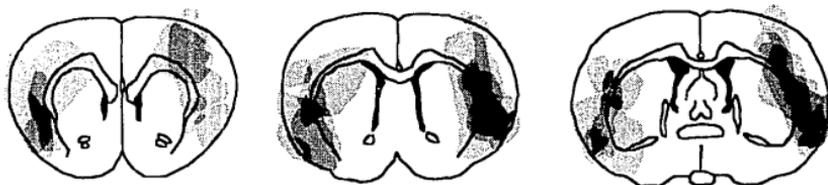
Figura 14. Resultados de las adquisiciones del condicionamiento aversivo al sabor de salina. El porcentaje de línea base se obtuvo tomando como 100% la media aritmética del consumo de las dos mañanas precedentes a la presentación del sabor (sacarina). (eem) error estándar de la media. (adq) adquisición. $p=0.01$ con respecto a todos los demás grupos. * $p<0.01$ con respecto al control.

el grupo CI-FCN (CON vs CI-Veh, $p<0.001$; CON vs Glfm-FCN, $p<0.001$; CON vs Glfm-Veh, $p<0.001$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas

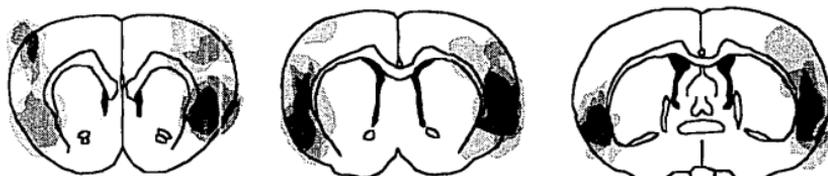
entre el CON y el grupo CI-FCN. Adicionalmente se encontraron diferencias significativas entre el grupo CI-FCN y los otros grupos que recibieron implantes (CI-FCN vs. CI-Veh, $p < 0.01$; CI-FCN vs. Gfcm-FCN, $p < 0.01$ CI-FCN vs. Gfcm-Veh, $p < 0.05$).

La revisión histológica de los cerebros (fig 15) mostró que en promedio los injertos de tejido fetal tuvieron un crecimiento robusto en alguno de los lados de la corteza insular, mientras que el del lado opuesto siempre tendió a ser más pequeño. No se observaron diferencias entre los injertos del grupo con FCN y el grupo con vehículo. En todos los casos al menos un trasplante de un lado estaba incluido en la corteza insular, aunque en general se observaron con un crecimiento en columna dorsalmente, siguiendo la vía de entrada de la jeringa, incluyendo en algunos casos crecimientos ectópicos y trasplantes aislados en corteza parietal. En el caso de los injertos de Gelfoam se notó que en algunos casos hubo reabsorción del mismo y en general se observaron dorsales a la corteza insular.

Grupo CI-FCN



Grupo CI-Veh



Ap Bregma +1.7

Ap Bregma +0.7

Ap Bregma -0.2



Figura 15. Resultados histológicos de los implantes de tejido fetal, en diagramas de cortes coronales que incluyen a la corteza insular. Los dibujos de los implantes hechos con cámara lucida (ver texto para una explicación) fueron sobrepuestos y se dibujó un grado de gris más oscuro las áreas de coincidencia entre los injertos, de tal manera que las áreas que solo fueron incluidas por un solo injerto quedaron gris claro, y las que fueron cubiertas por todos los injertos negras. Arriba se muestra la sobreposición de los injertos del grupo CI-FCN y abajo la del grupo CI-Veh. En el renglón inferior se muestra el número de coincidencias que cada tono de gris representa.

Discusión

Los resultados muestran que en la evocación del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), tanto los grupos control y los dos que recibieron injertos de tejido fetal fueron capaces de evocar la respuesta. En el caso de los controles el resultado fué el esperado, debido a que se sabe que el condicionamiento aversivo a los sabores produce una respuesta robusta que se puede manifestar días y hasta meses después de la adquisición (García, 1990). En el caso de los grupos con injertos fetales (CI-FCN, CI-Veh) el hecho de que la respuesta se haya presentado, es un indicio de que éstos injertos promovieron la recuperación, dado que la lesión que habían recibido anteriormente a la implantación inducía que la respuesta no pudiera ser manifestada, como se observó en el caso de los grupos con implantes de Gelfoam (Glfm-FCN, Glfm-Veh), los cuales al no poder recuperar la función, presentaron resultados similares a animales con lesión de la corteza insular (fig 8, Experimento 1). En el caso de la evocación del CAS, es de notarse que la aplicación del factor de crecimiento neuronal (FCN) no parece ejercer ningún efecto, ya que tanto los animales que recibieron trasplantes de corteza insular (CI) fetal con FCN como los que lo recibieron solo con el vehículo recuperaron la capacidad para evocar; mientras que los grupos Glfm-FCN y Glfm-Veh no pudieron recuperar y sus resultados son muy similares, a pesar de que el grupo Glfm-FCN recibió el factor, lo que sugiere que la recuperación de la evocación es un proceso independiente del FCN. No así la recuperación de la capacidad para adquirir un nuevo CAS. Como era de esperar, los animales que recibieron trasplantes con el

FCN (CI-FCN) fueron capaces de en dos ensayos obtener valores de aversión similares al control cuando fueron reentrenados para adquirir una nueva aversión condicionada (fig 14), pero ningún otro grupo implantado mostró recuperación, incluyendo el grupo CI-Veh que sí había mostrado recuperación para la evocación.

Los resultados para la adquisición (fig 14) replican los resultados obtenidos por Escobar, Russell et al. (en prensa) en los que a los 15 días post-transplante no se observa una recuperación de la capacidad para recuperar el CAS en animales transplantados, a menos que hayan sido adicionados con FCN. Los resultados aquí mostrados difieren en el hecho de que fué necesaria la presentación de dos ensayos de adquisición para poder observar una recuperación con valores similares al control, cuando en los modelos descritos hasta ahora solo un ensayo era suficiente para obtener valores similares al control. Esta discrepancia puede ser debida a alguno de dos factores; el primero, como se indicó en el procedimiento, el día de la primera prueba la temperatura del cuarto en donde habitaban todas las ratas tuvo un fuerte aumento, lo cual tiende a producir que todos los animales beban más líquidos de los que normalmente consumen. Aún en este caso, el efecto diferencial de la aplicación del FCN (aplicación= recupera, solo vehículo= no recupera) sí pudo hacerse patente dado que el grupo CI-FCN tuvo un valor de porcentaje de línea base significativamente menor que los demás grupos con implante, pero también está significativamente más alto que el control, por lo que no se puede aceptar la hipótesis nula de que no hay diferencia entre controles e injertados con CI y FCN. El hecho de que los animales controles sí hayan mostrado una aversión

a pesar de la alta temperatura, indica que posiblemente ésta explicación no sea la más correcta, ya que si hubo ratas que a pesar de las condiciones pudieron manifestar la respuesta, entonces queda sin resolverse la cuestión del por qué no pudieron manifestar la aversión, mientras que el grupo control sí. Una respuesta a ésta pregunta puede ser que los animales del grupo CI-FCN presentaban una recuperación parcial, por lo que necesitan de reentrenamiento, y la alta temperatura solo amplificó un efecto que ya estaba presente. Los estudios anteriores en la literatura no presentaron éste efecto probablemente debido a que entre aquellos y los presentes existen algunas diferencias metodológicas. La primera diferencia radica en que los animales del presente trabajo ya habían pasado previamente por una adquisición y prueba de condicionamiento aversivo a sacarina, lo que puede interferir con la adquisición del nuevo condicionamiento aversivo a la salina. La segunda diferencia, y probablemente la más importante, es que en éste experimento se utilizó por primera vez un trasplante fetal en una lesión inducida por la neurotoxina N-Metil-D-Aspartato (NMDA) en la CI; en los modelos anteriores de corteza insular solo se habían utilizado lesiones electrolíticas. Esta diferencia en el tipo de lesión también llevó a una diferencia en la morfología de los trasplantes, quedando éstos en forma de columna en el eje dorsoventral, en cambio los injertos en lesión electrolítica tienden a quedar contenidos en la zona de la lesión (Escobar et al., 1989). Esta diferencia posiblemente sea la causa de la discrepancia entre resultados, de tal manera que los trasplantes son más eficientes en lesiones electrolíticas que en lesiones de NMDA.

La similitud anatómica gruesa que mostraron los injertos fetales con o sin el FCN, así como la observación de que en ambos la presencia de la enzima Acetilcolinesterasa era mucho más baja que en el cerebro circundante, sugiere que es por similitudes por las que ambos injertos fueron capaces de inducir recuperación de la evocación. Sin embargo, la discrepancia entre los grupos con o sin el FCN en la adquisición no puede ser atribuida a ningún factor observado, por lo que posiblemente se deba a diferencias en el metabolismo de los injertos y a contenido y secreción de sustancias neuroactivas, como se ha sugerido por otros autores (López-García et al., 1990).

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.

Los resultados mostrados en el Experimento 1 indican que las lesiones post-consolidación producen que la evocación de las respuestas de condicionamiento aversivo a los sabores (fig 8) y de prevención pasiva (fig 6 y fig 7) no se manifieste. Este efecto indica que la corteza insular es necesaria e indispensable para el proceso de memoria a largo plazo para estas tareas. Se sugiere por tanto que la corteza insular es una estructura que participa ya sea en la retención o la evocación de éstas tareas. El aumento en el consumo tanto de las ratas controles y las lesionadas debido a la presentación de la solución de salina (fig 9) indica que ambos grupos fueron capaces de percibir el sabor diferente, mostrando una preferencia por este.

De esta manera se complementa la serie de resultados obtenidos en donde se demuestra la participación de la CI en la adquisición (Benjamin y Pfaffman, 1955; Braun, Lasiter y Kiefer, 1982) y consolidación (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991) del condicionamiento aversivo a los sabores, así como de la prevención pasiva (Bermúdez-Rattoni, Introini-Collinson y McGaugh, 1991). Las deficiencias en la evocación del CAS se adjudican a un problema en la capacidad de aprender y de memoria, dado que la suposición de que las deficiencias sean debidas a problemas en la percepción e integración de los estímulos debido a las lesiones, no se sostiene debido a que experimentos previos realizados en nuestro y en otros laboratorios indican lo contrario. En particular, en el caso del CAS, experimentos realizados por Braun, Lasiter y Kiefer (1980) encontraron que ratas

con ablación de la corteza gustativa (incluida la CI) muestran una curva de discriminación de un gradiente de molaridad para los cuatro sabores básicos (dulce, salado, ácido y amargo), que aunque los valores absolutos fueron diferentes a los controles (las lesiones de corteza gustativa tienden a disminuir el consumo de líquidos en general), el umbral de discriminación fué idéntico.

Las observaciones realizadas por los primeros grupos que se interesaron en la participación de estructuras de la corteza cerebral en el condicionamiento aversivo a los sabores muestran una clara participación de la CI en el aprendizaje de ésta conducta (Braun, Lasiter y Kiefer, 1980; para una revisión). Recientemente se ha mostrado la participación de la CI en la consolidación del CAS (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991) y los resultados aquí mostrados indican que la CI está involucrada además en la memoria a largo plazo de ésta conducta. Todo esto sugiere que la corteza insular es un sustrato neuroanatómico importante en todas las fases del continuo aprendizaje-memoria del condicionamiento aversivo a los sabores. Se puede suponer que la CI está involucrada en las cuatro fases descritas en el capítulo 1 (adquisición, consolidación, retención y evocación) dado que las lesiones durante cualquiera de éstas fases impiden la manifestación de la respuesta aprendida. Sin embargo la utilización de lesiones permanentes (electrolíticas y por neurotoxinas) no descartan contundentemente la posibilidad de que la participación de la CI sea solamente en la fase de evocación dado que independientemente de qué modelo se esté utilizando (incluyendo el presente) los

animales se encuentran lesionados cuando se les presenta el sabor de prueba. El experimento que se describe en la siguiente sección aclara este problema.

La participación de la CI en la prevención pasiva no presenta el problema antes descrito, dado que se ha podido estudiar por medio de lesiones reversibles, en las que se administra localmente en la CI un fármaco (particularmente tetrodotoxina) que inactiva temporalmente la región, dejándola completamente funcional una vez que se ha disipado el efecto. En estudios realizados por Bermúdez-Rattoni, Introini-Collinson y McGaugh (1991) se encontró que la inactivación por tetrodotoxina de la corteza insular antes e inmediatamente después del condicionamiento de prevención pasiva producen deficiencias en la prueba 48 hrs más tarde. Estas deficiencias pueden ser atribuidas directamente a una participación de la CI en el aprendizaje y la consolidación respectivamente, ya que durante la evocación de la respuesta, la CI de los animales se encontraba intacta, por lo que no se pueden atribuir las deficiencias observadas a una participación de la CI solo en la evocación de la respuesta. Por lo tanto, los presentes resultados aportan la noción de que la CI está adicionalmente involucrada en procesos de memoria a largo plazo de la prevención pasiva.

Los resultados presentados en el Experimento 2 muestran que la recuperación de la capacidad para evocar la memoria del condicionamiento aversivo a los sabores, a partir de déficits inducidos por lesiones de la CI, es posible mediante la utilización de la técnica de implantes cerebrales. La

implicación directa de éste resultado sobre el modelo de la participación de la CI en el condicionamiento aversivo a los sabores es que ésta última no puede ser el sustrato de la retención de la memoria, dado que su destrucción (lesión) produce deficiencias que pueden ser remediadas, lo que implica que el sustrato neuroanatómico de la retención debe localizarse en otras regiones, si es que se pudiere llegar a definir una o varias regiones específicas. Sin embargo, éstos resultados indican una importante participación de la corteza insular en el proceso de evocación de la memoria de la aversión condicionada al sabor. La participación en las primeras fases del contínuo aprendizaje-memoria (adquisición y consolidación) no ha podido ser bien elucidada, sin embargo existen algunas evidencias que apuntan a una participación de la CI directamente sobre la fase de adquisición. En estudios preliminares (Bermúdez-Rattoni, comunicación personal) se ha observado que la inactivación reversible de la corteza insular por medio de tetrodotoxina pre-adquisición produce deficiencias en la prueba, sin embargo la participación sobre la consolidación no ha sido esclarecida. Otra evidencia de la participación de la CI sobre la adquisición del CAS es la observación de recuperación de la capacidad de adquirir CAS de ratas lesionadas por medio de trasplantes fetales pre-adquisición (Bermúdez-Rattoni et al., 1987), lo cual indica que probablemente sea ésta fase la que se vea impedida por las lesiones y recuperada por los trasplantes. Una importante evidencia de ésta participación de la CI en la adquisición se encuentra implícita en los datos aquí presentados, mostrado por el hecho de los animales con implantes de CI, pero sin el Factor de Crecimiento Neuronal (grupo CI-Veh) fueron capaces de evocar la respuesta

adquirida pre-lesión pero incapaces de adquirir un nuevo condicionamiento aún con dos adquisiciones, lo cual indicaría una disociación del efecto de Lesión-Recuperación en la evocación, del de este efecto en la adquisición. Si el efecto de las lesiones de CI sobre el CAS fuera solo sobre la fase de evocación, y fuera ésta fase la que se recuperara por medio de los transplantes, no debería haberse observado la disociación, dado que los animales del grupo CI-Veh tenían transplantes capaces de recuperar la evocación (fig 13), pero aún así no pudieron adquirir una nueva respuesta aversiva al sabor (fig 14). Adicionalmente, el hecho de que los animales con transplantes de CI con el Factor de Crecimiento Neuronal (grupo CI-FCN) fueran capaces de recuperar la evocación de una respuesta previamente aprendida (fig 13) y además la adquisición de una nueva (fig 14), a diferencia del grupo CI-Veh que no recibió el FCN, indica que la recuperación de la capacidad para evocar es un proceso independiente del factor trófico, mientras que la recuperación de la adquisición (por lo menos a los 20 días post-implante) es un proceso dependiente de FCN exógeno. Esto apoya aún más la noción de la disociación del papel de la CI en la adquisición y en la evocación.

Existen dos posibles propuestas de mecanismos por los cuales la CI esté actuando sobre la evocación de la respuesta de CAS, que contengan a los datos previos en la literatura y a los presentes (fig 16). La primera propuesta establece que la CI podría ser el sustrato anatómico que subyace a la entrada y salida de la información para el CAS, de tal manera que las conexiones de ésta estructura con el resto del sistema, constituiría su función principal. La segunda propuesta

establece que la CI pudiera servir de entrada de la información, pero solo tuviera una acción tónica sobre las estructuras que subyacen a la retención y/o evocación. Esta segunda propuesta parece ser más plausible que la primera dado que la observación de la recuperación de la evocación se dá a los 15 días post-implante sin FCN que podría acelerar la formación de éstas conexiones, tiempo relativamente corto para que pudiesen aparecer conexiones entre el tejido huésped y el hospedero (Escobar et al., 1989). Dada esta consideración, las acciones tónicas que ejerciese la corteza insular sobre el resto del sistema pudieran ser de tipo difusibles o humorales, tales como factores tróficos endógenos o neurotransmisores. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que existieran conexiones transplante-hospedero que favorecieran la recuperación.

Dentro de los aspectos de este trabajo que serían importantes de seguir estudiando sería la posibilidad de las conexiones sinápticas funcionales a los 15 días post-implante, posiblemente a través de métodos electrofisiológicos, también sería conveniente la elucidación de qué componentes de los implantes sean los inductores de la recuperación. Esto último pudiera ser estudiado mediante la implantación de diferentes tejidos del SNC los cuales tuvieran diferentes composiciones, o la administración aguda o tónica de factores difusibles, tales como los neurotransmisores u otros factores. También queda por encontrar el sustrato neuroanatómico del trazo de memoria, aunque este problema ha sido elusivo a la neurobiología desde hace más de medio siglo de investigación.

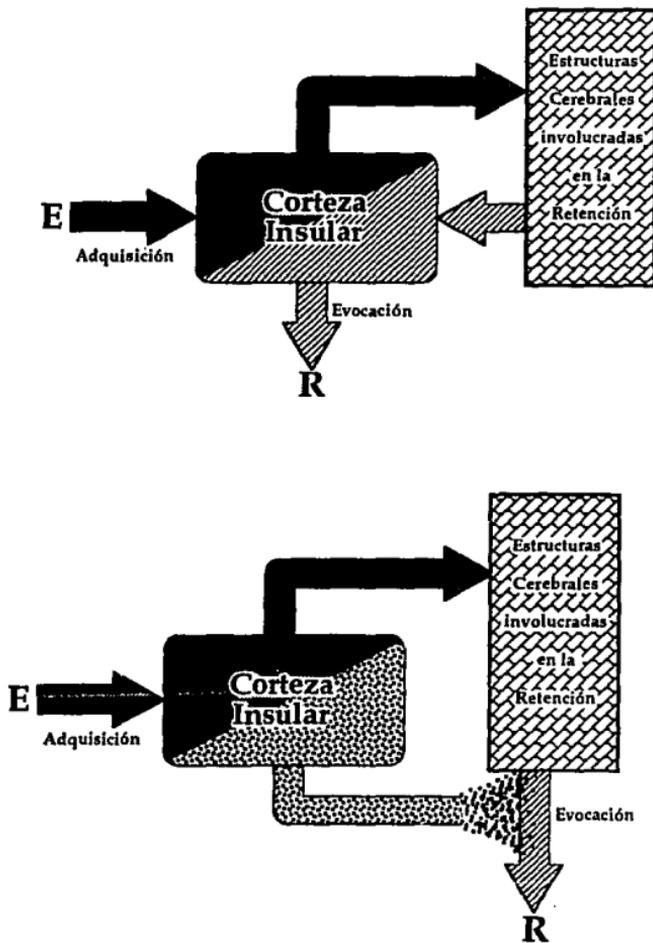


Figura 16. Esquema de los posibles mecanismos por los cuales la corteza insular se encuentre involucrada en la adquisición y la evocación (ver texto de la discusión general). Arriba se esquematiza la posibilidad de que la corteza insular sea la base física de la entrada y salida de la información. Abajo, la corteza insular pudiera solo modular la evocación por medio de factores difusibles. El sustrato anatómico de la retención se desconoce.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en ambos experimentos además de las consideraciones hechas hasta ahora, se puede concluir que:

- En la tarea de prevención pasiva, la medición de la variable de estancia en cada compartimento en un tiempo determinado, aporta datos consistentes con la medición de la latencia, por lo que se puede utilizar para constatar la tarea.
- Es posible obtener injertos del tejido funcionales, si son implantados en lesiones corticales inducidos por la neurotoxina N-Metil-D-Aspartato.
- La corteza insular de la rata no solo está involucrada en los procesos de adquisición y consolidación, como se ha reportado, del condicionamiento aversivo a los sabores, sino también en los procesos de memoria a largo plazo (retención y evocación).
- Esta estructura no es el sustrato anatómico del trazo de memoria para el condicionamiento aversivo a los sabores, pero es indispensable para su evocación. No se descarta, sin embargo, la posibilidad de que la corteza insular sea necesaria para mantener el trazo en otros sustratos.
- Las lesiones de corteza insular no afectan la capacidad de los animales para discriminar el sabor.

- El proceso de recuperación de la evocación del condicionamiento aversivo a los sabores por medio de implantes de tejido fetal es independiente del factor de crecimiento neuronal; mientras que la recuperación de la adquisición sí depende de este factor. Estas dos fases del continuo aprendizaje-evocación son dos entidades que utilizan diferentes mecanismos neurofisiológicos.

REFERENCIAS.

- Agranoff, B.W., Davis, R.E., Casola, L. y Lim, R. (1967) Actinomycin blocks formation of memory of shock avoidance. *Science*. **158**, 1600-1601
- Benjamin, R.M. y Pfaffman, C. (1955) Cortical localization of taste in the albino rat. *Journal of Neurophysiology*. **18**, 56-64
- Bermúdez-Rattoni, F., Escobar, M.L., Piña, A.L., Tapia, R., López-García, J.C. e Hiriart, M. (1992) Effects of NGF on the recovery of conditioned taste aversion in the insular cortex-lesioned rat. En R.L. Doty (ed.) Chemical Signals in Vertebrate VI. (pp. 297-303) Nueva York: Plenum Press
- Bermúdez-Rattoni, F., Fernández, J. y Escobar, M.L. (1989) Fetal brain transplants induce recovery of morphological and learning deficits of cortical lesioned rats. En L.E. Canedo, L.E. Todd, L.Packer y J. Jaz (eds.) Cell Function and Disease. (pp 112-128) Nueva York: Plenum Press
- Bermúdez-Rattoni, F., Fernández, J., Sánchez, M.A., Aguilar-Roblero, R., y Drucker-Colín, R. (1987) Fetal brain transplants induce recuperation of taste aversion learning. *Brain Research*. **416**, 147-152
- Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collinson, I.B. y McGaugh, J.L. (1991) Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **88**, 5379-5382

- Bermúdez-Rattóni, F., y Mc Gaugh, J.L. (1991) Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research*. **49**, 165-170
- Bermúdez-Rattóni, F., Ormsby, C.E., Escobar, M.L. y Hernández-Echeagaray, E. (en prensa) The rôle of the insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behavior. En J.L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattóni y R. Prado-Alcalá (eds.) Plasticity of the CNS: Learning and Memory. Nueva York: Lawrence Elsebaum & Assoc.
- Björklund, A., Lindvall, O., Isacson, O., Brundin, P., Victorin, K., Strecker, R.E., Clarke, D.J. y Dunnett, S.B. (1987) Mechanisms of action of intracerebral neural implants: Studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum. *Trends in Neuroscience*. **10**, 509-516
- Björklund, A. y Stevénin, U. (1984) Intracerebral neural implants: Neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries. *Annual Review of Neuroscience*. **7**, 279-308
- Björklund, A. y Stevénin, U. (1985) Neural Grafting in the Mammalian Central Nervous System. Amsterdam: Elsevier.
- Borison, H.L. y Wang, S.C. (1953) Physiology and pharmacology of vomiting. *Pharmacological Review*. **5**, 193-230
- Braun, J.J., Lasiter, P.S. y Kiefer, S.W. (1982) The gustatory neocortex of the rat. *Physiological Psychology*. **10**(1), 13-45

- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K. y Price, P.J. (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal: A new serum free combination. *Journal of Neuroscience Research*. 35(5), 567-576
- Brundin, P., Nilsson, O.G., Gage, F.H. y Björklund, A. (1985) Cyclosporin A increases survival of cross-species intrastriatal grafts of embryonic dopamine-containing neurons. *Experimental Brain Research*. 60, 204-208
- Chambers, K.C. (1990) A neural model for conditioned taste aversions. *Annual Review of Neuroscience*. 13, 373-385
- Coil, J.D. y Norgren, R. (1981) Taste aversions conditioned with intravenous copper sulfate: Attenuation by ablation of the area postrema. *Brain Research*. 212, 425-433
- Cotman, C.W. y Kesslak, P. (1988) The role of trophic factors in behavioral recovery and integration of transplants. En D.M. Gash y J.R. Sladek (eds.). Progress in Brain Research. Vol 78. (pp. 311-319). Amsterdam: Elsevier.
- Cotman, C.W. y Nieto-Sampedro, M. (1984) Cell biology of synaptic plasticity. *Science*. 225, 1287-1294
- Dugas du Villard, X., Her, C. y MacLeod, P. (1981) Qualitative discrimination of sweet stimuli: Behavioral study on rats. *Chemical Senses*. 6, 143-148

- Duncan, C.P. (1949) The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. **42**, 32-44
- Dunnett, S.B. y 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. y Björklund, A. (1988) Striatal lesions in the ibotenic acid-lesioned neostriatum: Functional studies. En D.M Gash y J.R. Sladek (eds.). Progress in Brain Research Vol. 78. (pp. 39-45) Amsterdam: Elsevier.
- Dunnett, S.B., Ryan, C.N., Levin, P.D: Reynolds, M. y Bunch, S.T. (1987) Functional consequences of embryonic neocortex transplanted to rats with prefrontal cortex lesions. *Behavioral Neuroscience*. **101**, 489-503
- Ernfors, P. Henschen, A., Olson, L. y Persson, H. (1989) Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal chord motoneurons. *Neuron*. **2**, 1605-1613
- Escobar, M.L., Fernández, J., Guevara-Aguilar, R. y Bermúdez-Rattoni, F.(1989) Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion. *Brain Research*. **478**, 368-374
- Escobar, M.L., Jiménez, N., López-García, J.C., Tapia, R. y Bermúdez-Rattoni, F. (en prensa) Nerve growth factor with insular cortical grafts induces recovery of learning and reestablish the graft choline acetyltransferase activity. *Journal of Neural Transplantation and Plasticity*.

- Escobar, M.L., Ormsby, C.E., Jiménez, N. y Bermúdez-Rattoni, F. (1993) Negative long term effects of insular cortex grafts on learning. *Society for Neuroscience Abstracts*. **19**, 1512
- Escobar, M.L., Russell, R.W., Booth, R.A. y Bermúdez-Rattoni, F. (en prensa) Accelerating behavioral recovery after cortical lesions: I. Homotopic implants plus NGF. *Behavioral and Neural Biology*.
- Fernández-Ruiz, J., Escobar, M.L., Piña, A.L., Díaz-Cintra, S., Cintra-McGlone, F.L. y Bermúdez-Rattoni, F. (1991) Time-dependent recovery of taste aversion learning by fetal brain transplants in gustatory neocortex-lesioned rats. *Behavioral and Neural Biology*. **55**, 179-193
- Flexner, I.B., Flexner, L.B. y Steller, E. (1963) Memory in mice is affected by puromycin. *Science*. **141**, 51-59
- Flood, J.F., Smith, G.E., Bennet, E.L., Alberti, M.H., Orme, A.E. y Jarrik, M.E. (1986) Neurochemical and behavioral effects of catecholamine and protein synthesis inhibitors in mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. **24**, 631-645
- Freed, W.J., Dymecki, J., Poltorak, M. y Rodgers, C.R. (1988) Intraventricular brain allografts and xenografts: Studies of survival and rejection with and without systemic sensitization. En D.M Gash y J.R. Sladek (eds.). Progress in Brain Research Vol. 78. (pp. 233-241) Amsterdam: Elsevier.

- Freed, W.J., Medinaceli, L. y Wyatt, R.J. (1985) Promoting functional plasticity in the damaged nervous system. *Science*. **227**, 1544-1552
- Gage, F.H. y Buzaki, C. (1989) CNS grafting: Potential mechanisms of action. En F.J. Seiz (ed.) Neural Regeneration and Transplantation. (pp. 211-226) Nueva York: A.R. Liss
- Gage, F.H. (1990) NGF-dependent sprouting and regeneration in the hippocampus. *Progress in Brain Research*. **83**, 357-370
- Gage, F.H. y Björklund, A. (1986) Enhanced graft survival in the hippocampus following selective denervation. *Neurosciences*. **17**, 89-98
- Gallo, M. y Bures, J. (1991) Acquisition of conditioned taste aversion in rats is mediated by ipsilateral interaction of cortical and mesencephalic mechanisms. *Neuroscience Letters*. **133**, 187-190
- Garcia, J. (1990) Learning without memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*. **2(4)**, 287-305
- Garcia, J., Kimeldorf, D.J. y Koelling, R.A. (1955) Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*. **122**, 157-158
- Garcia, J. y Koelling, R.A. (1966) Relation of cue to consequence in avoiding learning. *Psychonomic Science*. **4**, 123-124

- García, J., McGowan, B.K. y Green, K. (1972) Biological constraints on conditioning. En M.E.P. Seligman, J.L. Hager (eds.). Biological Boundaries of Learning. Nueva York:Mereditth
- García, J., Lasiter, P.S., Bermúdez-Rattoni, F. y Deems, D.A. (1985) General theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Science*. 443, 8-20
- Gibbs, R.B., Anderson, K. y Cotman, C.W. (1986). Factors affecting innervation in the CNS: Comparison of three cholinergic cell types transplanted to the hippocampus of adult rats. *Brain Research*. 383, 362-366
- Gibson, M.J. y Krieger, D.T. (1985) Neuroendocrine brain grafts in mutant mice. *Trends in Neuroscience*. 26, 331-334
- Grill, H.J. y Norgren, R. (1978) The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Research*. 143, 263-279
- Hefti, F. (1986) Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after transection. *Journal of Neuroscience*. 6, 2155-2162
- Ivanova, S.F. y Bures, J. (1990) Conditioned taste aversion is disrupted by prolonged retrograde effects of intracerebral injection of tetrodotoxin in rats. *Behavioral Neuroscience*. 104, 948-954
- Jeager, C.B. y Lund, R.D. (1980) Transplantation of embryonic occipital cortex to the tectal region of newborn rats: A light microscopic study of organization and connectivity of transplants. *Journal of Comparative Neurology*. 194, 571-597

- Jonsson, G. (1980) Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. *Annual Review of Neuroscience*. 3, 169-187
- Kandel, E.R. (1987) The long and short of memory in Aplysia: A molecular perspective. En E. Costa (ed.) Fidia Research Foundation Neuroscience Awards Lectures 1986. (pp. 7-47). Padova: Liviana Press.
- Kiefer, S.W. (1985) Neural mediation of conditioned food aversions. *Annals of the New York Academy of Science*. 443, 100-109
- Korshing, S., Auburger, G., Heuman, R., Scott, J. y Thoenen, H. (1985) NGF: Studies of mechanisms of action. *EMBO Journal*. 4, 1389-1393
- Krusher, L.A. y van der Kooy, D. (1988) Visceral cortex: Integration of the mucosal with limbic information in the rat agranular insular cortex. *Journal of Comparative Neurology*. 270, 534-541
- Lashley, K.S. (1950) In search of the engram. En The Company of Biologists Ltd.(ed.) Society of Experimental Biology Symposium No. 4: Physiological Mechanisms in Animal Behavior. (pp. 287-313). Cambridge: Cambridge University Press.
- Lasiter, P.S. y Glanzman, D.I. (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

- Levi-Montalcini, R. y Hamburger, V. (1953) A difussible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyprneuronization of viscera in the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology*. **116**, 321-362
- López-García, J.C., Fernández-Ruiz, J., Bermúdez-Rattoni, F. y Tapia, R. (1990) Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts. *Brain Research*. **523**, 105-110
- Lubek, I. y Apfelbaum, E. (1987) Neo-behaviorism and the Garcia effect: A social psychology of science approach to the history of a paradigm clash. En M.G. Ash y W.R. Woodward (Eds.) Psychology in Twentieth-Century Thought and Society. (pp. 59-91). Cambridge: Cambridge University Press
- Manthorpe, M., Nieto-Sampedro, M., Skaper, S.D., Lewis, E.R., Bardin, G., Long, F.M., Cotman, C.W. y Varon, S. (1983) Neurotrophic activity in brain wounds of the developing rat: Correlation with implant survival in the wound cavity. *Brain Research*. **267**, 47-56
- McGaugh, J.L.. (1966) Time dependant process in memory storage. *Science*. **153**, 1351-1358
- McGaugh, J.L., Introini-Collinson , I.B. y Nagahara, A.H. (1988) Memory enhancement with intra-amygdala posttraining naloxone is blocked by concurrent administration of propanolol. *Brain Research*. **466**, 37-49

- McGaugh, J.L., Introini-Collinson, I.B., Nagahara, A.H., Cahill, L., Brioni, J.D y Castellano, C. (1990) Involvement of the amygdaloid complex in neuromodulatory influences on memory storage. *Neuroscience and Biobehavioral Review*. **14**, 425-431
- Nieto-Sampedro, M. y Cotman, C.W. (1986) Growth factor induction and temporal order in CNS repair. En C.W. Cotman (ed.) Synaptic Plasticity and Remodeling. (pp. 407-456) Nueva York: Gilford Press
- Norgren, R. (1974) Gustatory afferents to ventral forebrain. *Brain Research* **81**, 285-295
- Norgren, R. y Wolf, G. (1975) Proyections of thalamic gustatory and lingual areas in the rat. *Brain Research*. **92**, 123-129
- Ormsby, C:E, Piña, A.L. y Bermúdez-Rattoni, F. (1991) Long-term retrograde amnesia on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion learning tasks by insular cortex lesions. *Society for Neuroscience Abstracts*. **17**, 1045
- Ormsby, C.E., Piña, A.L, Ramírez-Amaya, V. y Bermúdez-Rattoni, F. Differential effects of insular cortex lesions in a place conditioning task (1993) *Society for Neuroscience Abstracts*. **19**, 1229
- Pascoe, J.P. y Kapp, B.S. (1987) Responses of the amygdaloid central nucleus neurons to stimulation of the insular cortex in awake rabbits. *Neuroscience*. **21**, 471-485

- Patton, H.D. (1950) Physiology of smell and taste. *Annual Review of Physiology*. **12**, 267-296
- Pavlov, I.P. (1927) Reflejos condicionados e inhibiciones. En Obras Maestras del Pensamiento Contemporáneo. Vol.17. (1994). Barcelona:Planeta
- Paxinos, G. y Watson, C. (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press
- Pfaffman, C., Frank, M. y Norgren, R. (1979) Neural mechanisms and behavioral aspects of taste. *Annual Review of Psychology*. **30**, 283-325
- Piccardo, P., Maysinger, D. y Cuello, A.C. (1992) Recovery of nucleus basalis cholinergic neurons by grafting NGF secretor fibroblasts. *Neuroreport*. **3**, 353-356
- Piña, A.L., Ormsby, C.E. y Bermúdez-Rattoni, F. (1994) Differential recovery of inhibitory avoidance learning by striatal, cortical, and mesencephalic fetal grafts. *Behavioral and Neural Biology*. **61**, 196-201
- Piña, A.L., Ormsby, C.E., Miranda, M.I., Jiménez, N., Tapia, R. y Bermúdez-Rattoni, F. (1994) Graft-induced recovery of inhibitory avoidance is related to choline acetyltransferase activity. *Journal of Neural Transplantation and Plasticity*. **5**(1), 1-7
- Reisman, G. (1969) Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Research*. **14**, 25-48

- Remie, R., van Dongen, J.J., Rensema, J.W. y van Wunnik, G.H.J. (1990) The rat as an experimental animal. En J.J. van Dongen, R. Remie, J.W. Rensema y G.H.J. van Wunnik (eds.) Manual of Microsurgery on the Laboratory Rat. (pp. 3-6) Amsterdam: Elsevier
- Rescorla, R.A. y Holland, P.C. (1982) Behavioral studies of associative learning in animals. *Annual Review of Psychology*. **33**, 265-308
- Rescorla, R.A. (1988) Pavlovian conditioning: It's not what you think it is. *American Psychologist*. **43**, 151-60
- Rozin, P. (1967) Specific aversions as a component of specific hungers. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. **64**, 237-242
- Seiger, A. (1985) Preparation of immature central nervous system regions for transplantation. En A. Björklund y U. Steveni (eds.) Transplantation in the Mammalian CNS. (pp. 71-77) Amsterdam: Elsevier.
- Siegel, S. y Castellan, N.J.Jr. (1988) Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. Singapur: McGraw-Hill
- Shirai, Y. (1921) Transplantation of rat sarcoma in adult heterogeneous animals *Japanese Medical World*. **1**, 14-15. Reimpreso en A. Björklund y U. Steveni (eds.) (1985) Transplantation in the Mammalian CNS. (pp. 5-6) Amsterdam: Elsevier.

Skinner, B.F. (1989) The origins of cognitive thought. *American Psychologist*. **44**, 13-

18

Spear, N.E., Miller, J.S. y Jagielo, J.A. (1990) Animal memory and learning. *Annual Review of Psychology*. **41**, 169-211

Springer, J.E., Collier, T.J., Notter, F.D., Loy, R. y Sladek, J. (1988) Central nervous system grafts of nerve growth factor rich tissue as an alternative source of trophic support for axotomized cholinergic neurons. En D.M Gash y J.R. Sladek (eds.). Progress in Brain Research Vol. 78. (pp. 401-407) Amsterdam: Elsevier.

Stevani, U., Björklund, A. y Svenggaard, N. (1976) Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: Techniques and conditions for survival. *Brain Research*. **114**, 1-20

Teuber, H.L. (1974) Behavioral recovery after brain damage. *Neuroscience Research Programmed Bulletin*. **12**, 197-199

Thoenen, H. y Barde, Y.A. (1980) Endogenous trophic factors. *Physiological Review*. **60**, 1284-1334

Thompson, R.F. (1986) The neurobiology of learning and memory. *Science*. **233**, 941-947

- Toniolo, G., Dunnett, S.B., Hefti, F. y Will, B. (1985) Acetylcholine rich transplants in the hippocampus: Influence of intrinsic growth factors and application of nerve growth factor on choline acetiltransferase activity. *Brain Research*. **345**, 141-146
- Varon, S., Hagg, T., Vahlsing, L. y Manthorpe, M. (1989) Nerve growth factor in vivo actions on cholinergic neurons in the adult rat CNS. En L.E. Todd, L. Packer y J. Jaz (eds.) Cell Function and Disease. (pp. 235-248) Nueva York: Plenum Press
- Victorin, K., Simerly, R.B. Isacson, O., Swanson, L.W. y Björklund, A. (1989) Connectivity of striatal grafts implanted into the ibotenic acid lesioned striatum. III. Eferent projecting graft neurons and their relation to host afferents within the grafts. *Neuroscience*. **30(2)**, 427-492
- Yamamoto, T., Yayama, N. y Kawamura, Y. (1981) Cortical neurons responding to tactile, thermal, and taste stimulations of the rat's tongue. *Brain Research*. **221**, 202-206