

03081
7
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**RECUPERACION DEL RECUERDO DE AVERSIONES AL SABOR:
UN ESTUDIO CON IMPLANTES CEREBRALES.**

T E S I S

Que para optar por el grado de
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

Christopher Edward Ormsby Jenkins

Director de Tesis:
Dr. Federico Bermúdez Rattoni



UNAM - CCH

México, D.F.

Septiembre 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Los estudios aquí presentados fueron realizados en el laboratorio del Dr. Federico Bermúdez Rattoni en el Instituto de Fisiología Celular. Le agradezco los recursos, orientación y paciencia que me proporcionó durante la realización de este trabajo.

Parte de este trabajo fué realizado también en colaboración con el Mtro. Víctor Ramírez Amaya, por lo que le agradezco su valiosa ayuda. Asimismo agradezco la asistencia técnica de Oreste Carbajal.

Los estudios de Maestría que culminan en este trabajo fueron apoyados por una beca otorgada por medio de los proyectos IN204689 e IN201993 de la DGAPA de la UNAM.

ÍNDICE

	Página
Resúmen.	4.
Antecedentes.	5.
I. El estudio científico de la memoria	5.
II. El condicionamiento aversivo a los sabores	18.
III. La corteza insular de la rata y su estudio	27.
IV. Los implantes de tejido neuronal y modelos de recuperación funcional	32.
V. El estudio de las funciones de la corteza insular mediante implantes cerebrales	39.
Objetivos.	52.
Procedimientos experimentales y resultados.	54.
<i>Abstract.</i>	55.
<i>Experiment 1.</i>	60.
<i>Subjects.</i>	61.
<i>General Procedures.</i>	61.
<i>Results..</i>	67.
<i>Experiment 2..</i>	74.
<i>Subjects..</i>	74.
<i>General Procedures..</i>	74.
<i>Results..</i>	77.
<i>Discussion..</i>	84.
<i>References..</i>	90.
Discusión.	95.
Referencias.	111.

RESÚMEN

Estudios previos han demostrado que implantes fetales corticales son capaces de inducir recuperación en la habilidad para adquirir un condicionamiento aversivo al sabor (CAS) y la tarea de prevención pasiva en ratas lesionadas en la corteza insular (CI). Con el fin de probar los efectos que estos implantes tienen sobre la habilidad para evocar la memoria de un CAS adquirido previo a la lesión, se realizaron los siguientes experimentos. En un primer experimento, ratas fueron entrenadas en un CAS pareando un sabor de sacarina con un malestar gástrico inducido por una inyección ip de cloruro de litio. Cuatro días después, todos los animales excepto un grupo control intacto (CON) fueron lesionados bilateralmente en la CI mediante microinyecciones de N-Metil-D-Aspartato y 10 días después los animales lesionados fueron divididos en tres grupos: Uno recibió en las áreas lesionadas implantes homotópicos de CI fetal de 15 días de gestación (CxI), otro recibió corteza occipital, y uno permaneció lesionado. Cuarenta y cinco días después de la implantación, todos los animales fueron probados para la retención al CAS a sacarina, y después reentrenados para un nuevo CAS al sabor de salina. Ambos grupos implantados mostraron un recuerdo del CAS a sacarina similar al grupo CON, pero solo el grupo CxI mostró adquisición del nuevo CAS a la salina. En un segundo experimento, ratas fueron entrenadas para CAS a sacarina y lesionados 4 días más tarde. En este caso los animales lesionados fueron divididos en cuatro grupos, un grupo (CI+FCN) recibió CI fetal suplementado con factor de crecimiento neuronal (FCN), otro recibió CI fetal con vehículo (CI-Veh), y dos grupos más recibieron implantes de gelfoam embebidos en FCN o vehículo, respectivamente. Los animales fueron probados 15 días después del implante para la evocación del CAS a sacarina, y reentrenados con salina. Ambos grupos con implantes de CI fetal recuperaron el recuerdo del CAS a sacarina; pero solo el grupo CI+FCN también recuperó la habilidad de aprender el nuevo CAS a salina. Los grupos que recibieron gelfoam embebido ya sea con FCN o vehículo no recuperaron ni el recuerdo ni la capacidad de aprender los CAS. Se concluye que implantes de corteza fetal en la CI lesionada son capaces de inducir recuperación de la capacidad de recordar CAS adquiridos previos a la lesión, aunque solo implantes homotópicos a los 45 días post implante, o a los 15 con suplemento de FCN, inducen recuperación de la habilidad para aprender CAS. Los resultados sugieren que los mecanismos implante-hospedero que permiten la recuperación del recuerdo son distintos de los de la recuperación de habilidades de aprendizaje.

ANTECEDENTES.

I. El Estudio Científico de la Memoria.

Los primeros trabajos científicos sobre el estudio de la memoria se remontan a 1885, cuando Herman Ebbinghaus anunció un método de estudio-prueba y los resultados experimentales que con él obtuvo. El procedimiento consistía en aprender una larga serie (de 20 a 50) palabras sin sentido y probar escribir las más palabras posibles que se recuerden. Esta tarea se repite con diferentes tiempos entre el estudio y la prueba. Ebbinghaus encontró que el recuerdo se podía dividir en dos fases, una en la que el recuerdo era bueno, pero caía rápidamente al aumentar el intervalo entre el estudio y la prueba, y otra después de esta caída en que se alcanzó un nivel relativamente estable (fig. 1). A la primera fase le llamó memoria a corto plazo, y a la segunda memoria a largo plazo. Esta disociación entre las dos fases se encontró en casos de lesiones cerebrales experimentales.

Por otro lado, observaciones clínicas habían ayudado al avance del conocimiento de la memoria y sus bases neurales,

pero faltaba una interacción recíproca entre la clínica y la investigación experimental que estimulara mayor avance. Por ejemplo, la distinción reciente y ampliamente aceptada entre los tipos declarativo y no declarativo de memoria, que tienen correspondencia con la descripción de Ebbinghaus 70 años antes, surgió a partir de investigaciones encaminadas a encontrar qué tipos de memoria se pierden y cuáles son mantenidos después de ciertos tipos de daño cerebral. Esta distinción entre tipos de memoria fue necesaria para poder encontrar cuáles eran las diferentes estructuras cerebrales usadas en cada una, y para poder así entender diferentes tipos de amnesia (Squire, Knowlton & Musen, 1993). Aunque todavía existe gran controversia acerca de cómo definir las fases y los tipos de memoria, sí existe un consenso en que el estudio de la memoria desde el punto de vista neurofisiológico debe incluir divisiones por fases y tipos.

La propuesta hecha por Donald Hebb (1949) de que la memoria se podría explicar por medio de cambios en la capacidad de transmisión de las conexiones (sinapsis) entre las neuronas, formando de esta manera circuitos (redes) neuronales que podrían cambiar con la experiencia, tenía como intención explicar como estas redes neuronales (que él

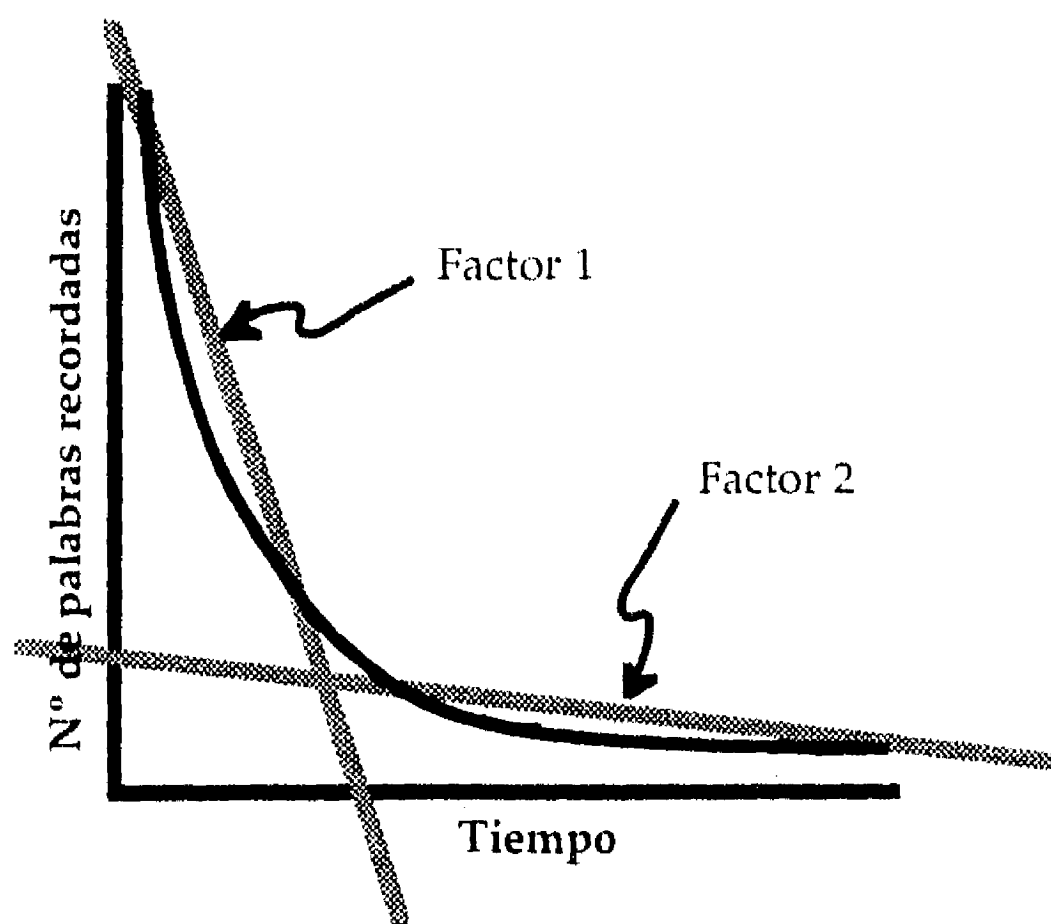


Figura 1. Esquema del tipo de resultados que obtuvo H. Hebbinghaus que le llevó a postular que la memoria consiste en por lo menos dos factores discernibles. El Factor 1 se denominó como memoria a corto plazo, y el Factor 2 como memoria a largo plazo.

llamaba "secuencias de fase" y "ensamblajes celulares") podían explicar fenómenos tales como la percepción y la memoria. Esta idea ha prevalecido hasta nuestros días y es fundamento de la mayoría de los estudios sobre las bases físicas de la memoria. Sin embargo, como lo señala Rosenzweig (1996), la mayoría de los científicos en neurociencias se han concentrado más en cómo los cambios

sinápticos pueden almacenar la información, y no cómo los circuitos neuronales pueden procesar dicha información.

Los investigadores han propuesto una variedad de circuitos neurales y redes en los cuales la información puede ser almacenada y las respuestas de memoria procesadas. Los circuitos neurales varían desde cadenas neuronales simples hasta circuitos paralelos distribuidos.

La cadena neural más sencilla es el arco reflejo monosináptico, y esta ha sido utilizada para describir el mecanismo de un aprendizaje sencillo (habitación) del reflejo de contracción de la branquia en el molusco *Aplysia* (p.e. Kandel, Schacher, Castelluci & Goelet, 1987; Kupferman & Kandel, 1969). Muchos circuitos neurales sencillos reciben entradas desde, o son supeditadas por, circuitos de orden superior, y la plasticidad inducida por aprendizaje puede ocurrir en este nivel. De ésta manera, en el condicionamiento del párpado de los animales, parece ser que el sitio de plasticidad necesario para el condicionamiento es un circuito de orden superior en el cerebelo (Lavond, Kim & Thompson, 1993), mientras que el circuito del reflejo básico en el tallo cerebral no muestra cambio durante el aprendizaje. Aún en donde se han encontrado cambios sinápticos en un arco reflejo monosináptico, los cambios necesarios y suficientes para que se dé el aprendizaje y la memoria pueden también

darse en otras partes del sistema nervioso. De esta manera, la respuesta de contracción de la branquia en la *Aplysia* persiste y puede ser alterada por entrenamiento después de la remoción quirúrgica del ganglio abdominal. El sistema nervioso central (SNC) de la *Aplysia* entra en un estado suprimido después de que el animal ha ingerido alimento o ha tenido actividad sexual, pero aún cuando el SNC está inactivado, el animal todavía es capaz de mostrar la respuesta de contracción de la branquia, mediado por el sistema nervioso periférico. Así, la circuitería neural de la respuesta de contracción de la branquia incluye células del sistema periférico, y por ello esta conducta es más compleja de lo esperado, y mucho depende de pequeñas células difusas que son inaccesibles al actual estudio de la neurofisiología (Leonard, Edstrom & Lukowiak, 1989).

Muchas de las teorías recientes sugieren que el mismo ensamble de neuronas pueden codificar muchas memorias diferentes, cada neurona participando en mayor o menor medida en una memoria particular (McNaughton & Morris, 1987). Investigaciones recientes sugieren que la modificación de la respuesta de contracción de la branquia en la *Aplysia* pudiera depender de procesamiento distribuido en paralelo en un ensamble muy grande de neuronas, más que en unas cuantas neuronas en un arco reflejo monosináptico. Los

diferentes tipos de respuestas mediados por estas neuronas parecen ser generados por actividades alteradas de una gran red distribuída única, en lugar que por pequeñas redes separadas, cada una dedicada a una respuesta particular.

Las investigaciones de aprendizaje y memoria en aves y mamíferos indican que involucran sitios neurales ampliamente distribuídos en el cerebro, tal como Hebb supuso como probable para los ensambles celulares. Los estudios de Thompson y colaboradores (Lavond et al., 1993) se han centrado en aislar el circuito neural necesario para el relejo del parpadeo condicionado, y han encontrado su locus en núcleos cerebelares, pero aseguran que otras estructuras, incluyendo el hipocampo y la corteza cerebral juegan papeles importantes en aprendizajes más complejos, así como ser a su vez influenciados por estos substratos.

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 inclusive en procesamiento de señales y transducción al nivel celular o molecular.

En la actualidad, se considera que un organismo que es sometido a condiciones que produzcan aprendizaje, considerado como un cambio relativamente permanente de la conducta debido a la experiencia, debe sufrir cambios biológicos que sustenten este cambio.

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 estas 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 esta base física. El atribuir a la memoria características del sustrato neurofisiológico implica la localización de estructuras neuronales cuya conectividad cambie, produciendo vías 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 (Lashley, 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. Estudios más recientes, principalmente en el molusco *Aplysia* (Kandel et al., 1987) y en el reflejo de la membrana nictinante del conejo (Thompson, 1986), han puesto en tela de juicio este postulado en su forma original, demostrando especificidad neuronal dentro de las áreas funcionales. Sin embargo ha servido como principio para un sinnúmero de estudios sobre la neurofisiología de la memoria y parece conservarse salvo en los trabajos mencionados.

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. Como se mencionó, 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 (hacer permanente) una 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 confirmaron estas sugerencias y elucidaron de manera más precisa el curso temporal de la MCP y de la consolidación de la MLP (Agranoff, Davis, Casola & Lim, 1967; Duncan, 1949; Flexner, Flexner & Steller, 1963; Flood et al., 1986; McGaugh, 1966).

Estos estudios permiten formar un bosquejo de la función temporal que atraviesa el continuo aprendizaje y la memoria (fig. 2). La información entra al organismo en forma

de estímulos que actúan sobre los sentidos, lo que puede tener una reacción inmediata (reflejo, adaptación sensorial, etc.) o no, pero en el caso del aprendizaje esta estimulación es asociada con una segunda, diferente pero contingente, de origen externo o interno. El organismo debe quedar relativamente intacto por un tiempo corto (minutos u horas, dependiendo de los estímulos) para que esta asociación se pueda mantener por largos periodos (se consolide), después de lo cual muy pocas alteraciones del organismo afectan el fenómeno de que la presentación del primer estímulo evoque la respuesta del segundo (recuerdo).

Esta sobresimplificación de las fases de memoria (fig. 2) no considera explícitamente los diferentes tipos, y aprendizajes más complicados, pero muestra los estados del organismo durante un procedimiento de aprendizaje y su posterior recuerdo, de una manera interpretable para todos los tipos de aprendizaje y memoria, incluyendo los abarcados en el presente trabajo.

Son a estos estados y fases de memoria representados en la fig. 2 por los que pasa el organismo a los que los presentes experimentos se encaminaron a estudiar, por lo que no se menciona aquí una interpretación y modelos más exhaustivos de las fases y tipos de memoria.

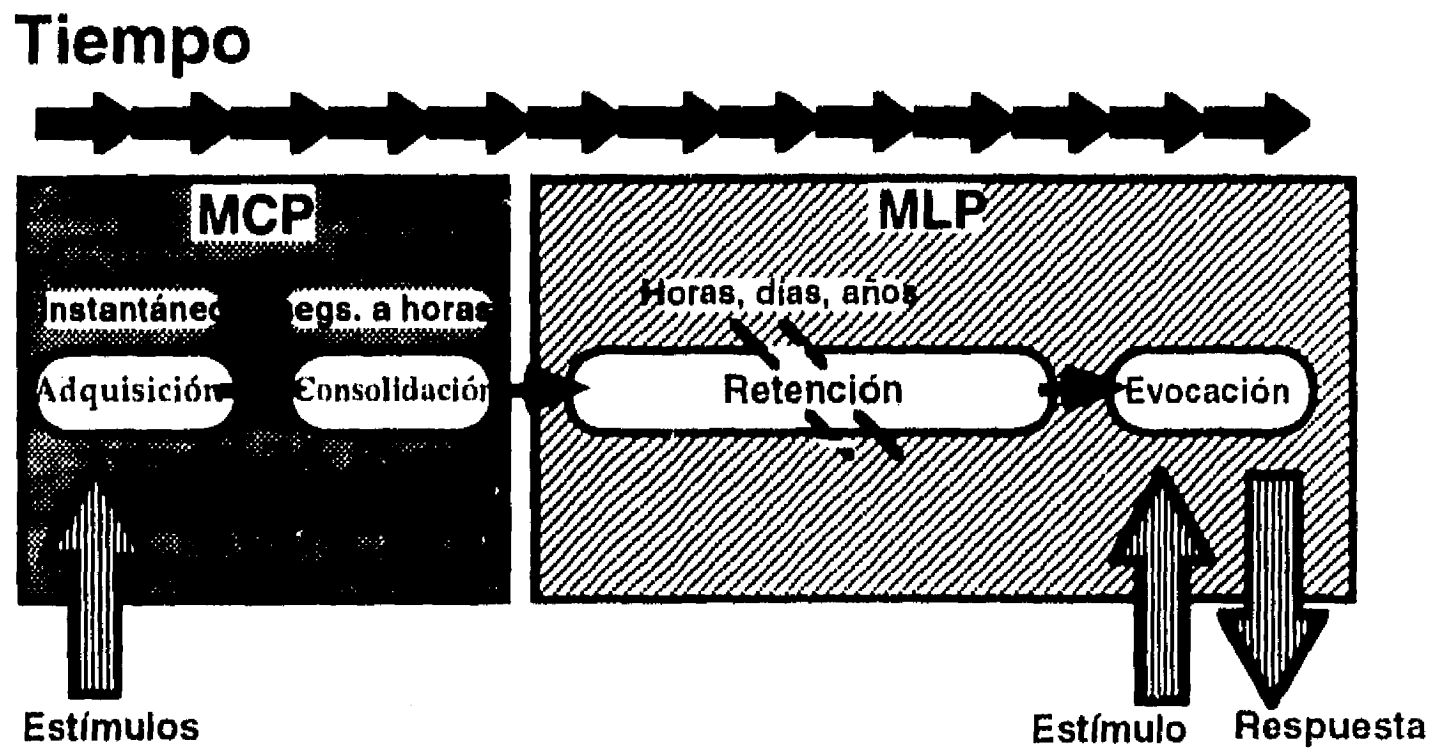


Figura 2. El continuo aprendizaje-evocación. En el lado derecho se muestran la adquisición (presentación de una contingencia de estímulos) y la consolidación (retención por corto tiempo de ésta información, así como la transformación a memoria de largo plazo), que son las dos etapas que pertenecen a la memoria a corto plazo (MCP). 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 (MLP).

Rescorla y Holland en 1982 (Rescorla & Holland, 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 los condicionamientos pavlovianos la respuesta condicionada rara vez era idéntica a la respuesta incondicionada, llevaron 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. No es difícil generar explicaciones para el descuido histórico de los temas de la expresión en el campo del aprendizaje animal. En el campo de la psicología experimental ha habido por mucho tiempo una disposición para tratar al aprendizaje como inseparable de la respuesta usada para medirlo. La orientación estímulo-respuesta de Thordike patrocinó en gran medida esta distorsión, así como el positivismo lógico ortodoxo, opacando la distinción entre los experimentos, que necesariamente miden una respuesta particular a una 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, es en realidad una suma de varias fases consistentes en (fig. 2): 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.

Las tres primeras fases del continuo arriba descrito no son en realidad observables, al menos en 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 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 algunas de estas fases y no el proceso íntegro y total (para una revisión de este problema, ver Spear, Miller & Jagielo, 1990).

II.El Condicionamiento Aversivo a los Sabores.

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

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

En el paradigma pavloviano, un estímulo (estímulo incondicionado, EI) que provoca una respuesta (respuesta

incondicionada, RI) es pareado con otro estímulo (estímulo condicionado, EC) que no provoca la respuesta RI. Los dos estímulos son pareados de tal manera que sean contiguos y que el EC pueda proveer información acerca del EI (Rescorla, 1988). El aprendizaje se puede inferir cuando la presentación del EC produce una respuesta similar a la RI, denominada respuesta condicionada (RC).

Aunque se considera 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, es decir, el malestar no parece producir una modificación de la conducta similar a la evitación del sabor, dado que este último ya no está presente. Un condicionamiento aversivo al sabor puede ocurrir sin una RI observable (Garcia, McGowan & Green, 1972). Generalmente se ha aceptado conceptualizar a este paradigma con sólo las tres variables evidentes, sin embargo, se han postulado soluciones para obtener una conceptualización más adecuada.

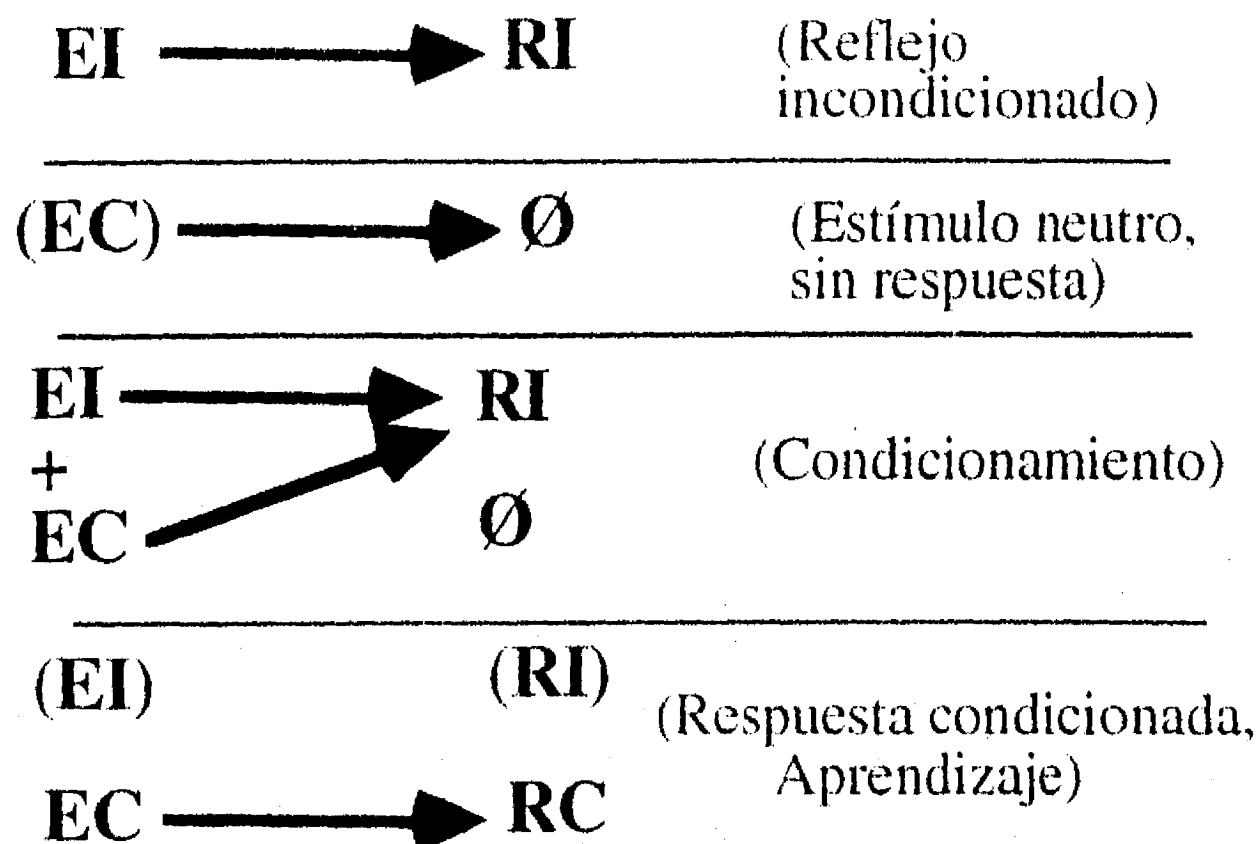


Figura 3. Esquema representando el proceso del condicionamiento clásico, descrito por Pavlov (1927, 1994). Se comienza con un estímulo incondicionado (EI) que produce un reflejo o respuesta incondicionada (RI). Por otro lado, hay un estímulo neutro que no produce la RI, y que es el que será después del condicionamiento el estímulo condicionado (EC). El condicionamiento consiste en presentar contingentemente ambos estímulos varias veces, lo que produce que eventualmente el EC produzca una respuesta condicionada (RC) muy similar a la RI.

Una solución al problema la ha postulado K. C. Chambers (1990) a partir de diversos estudios en donde se analiza detalladamente la situación de aprendizaje. Los

estímulos gustativos pueden provocar 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 en menor ingesta. Cuando los animales sufren malestar después del consumo de una sustancia que 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 provocada 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, si no específico al EC. La RC no es similar a la respuesta provocada por el EC antes del condicionamiento, de hecho es opuesta. Consecuentemente el EI no actúa como el provocador de lo que serán las características esenciales de la RC, sino que cambia la respuesta provocada por el EC de una forma (ingestiva) a otra (aversiva) (Chambers, 1990).

Una segunda aproximación teórica para resolver el problema de las peculiaridades del condicionamiento aversivo a los sabores fué propuesta por el mismo Garcia (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 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 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 palatable a aversivo, por lo que al volverse a presentar el sabor la RI habrá cambiado a una evitación (RC). En este caso desaparece el EC del modelo Pavloviano tradicional, sin embargo no resulta necesario, puesto que el mecanismo de RA es el que modifica directamente la respuesta subsiguiente al EI (sabor) y no la contingencia entre dos estímulos. Aquí el punto clave sería que los sabores poseen características particulares que concuerdan con una acción interna, no una externa como es

en el caso de la mayoría de los paradigmas de aprendizaje animal. De esta manera si los estímulos son externos, probablemente no alteren el valor de la RA sobre cada uno de ellos, pero si será importante su interacción mutua, tal y como lo describe Pavlov. Si en cambio el estímulo es interno, tal como los sabores, drogas o rayos gamma, seguramente afectará el valor de la RA, por lo que las leyes de interacción entre estímulos dependerá de la organización particular del organismo, y no de las Pavlovianas.

De una manera coloquial y antropomorfizando, se podría decir que el modelo de Pavlov, revisado por Chambers, diría que el animal no consume el sabor condicionado porque tiene "conocimiento" de que produce evitación, aunque le siga "gustando" el sabor. El modelo de Garcia en cambio diría que el animal no ingiere porque verdaderamente tiene, ahora, un sabor desagradable, independientemente de como era antes.

El enfoque EC-EI-RA implica que el estudio conductual no puede estar aislado de su sustento fisiológico lo que aporta una visión de mayor interdisciplinaridad. 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

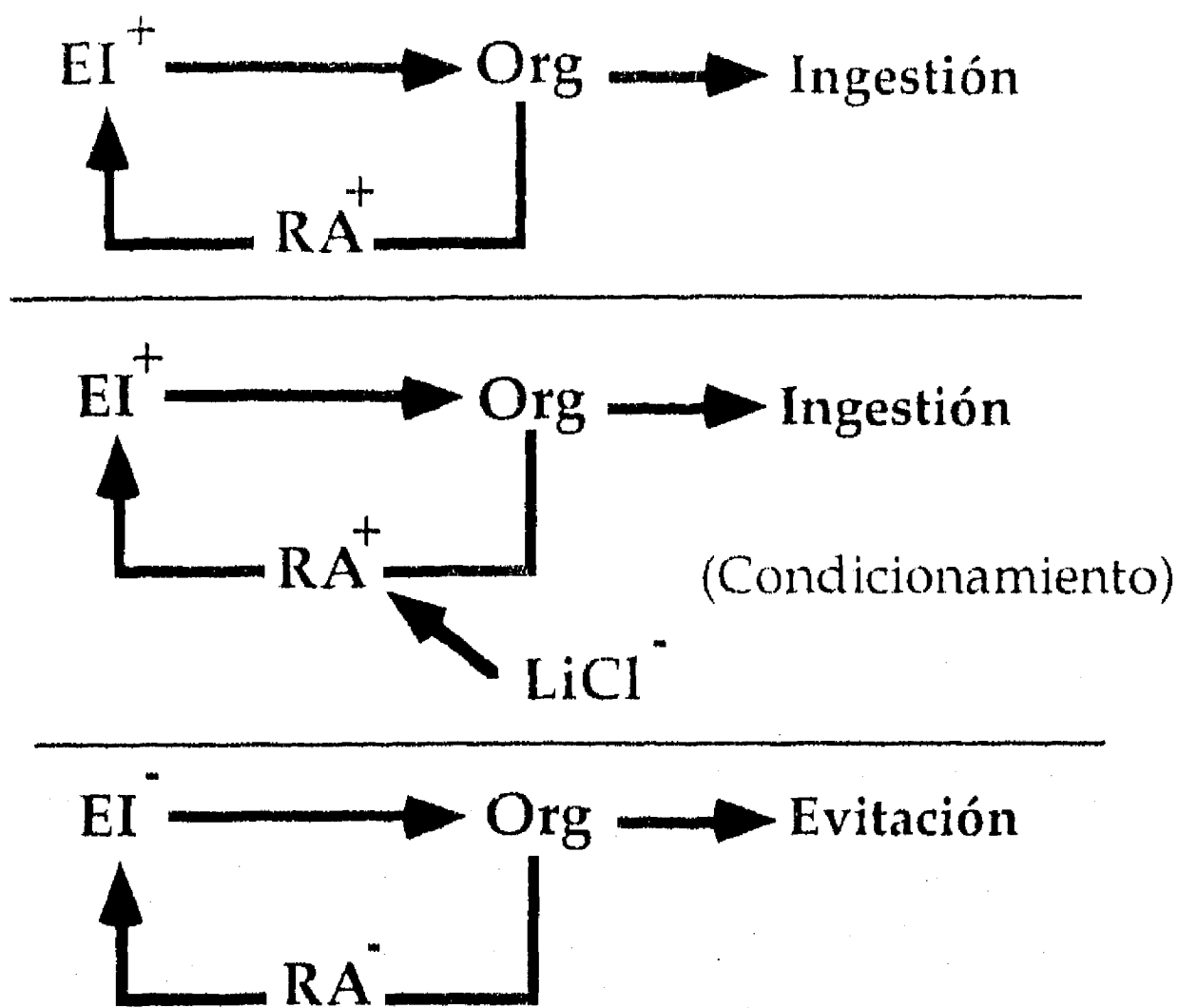


Figura 4. Esquema del condicionamiento de condicionamiento aversivo al sabor propuesto por Garcia (1990). En este caso un estímulo sávido incondicionado (EI) actúa sobre el organismo (Org) el cual al no tener consecuencias produce una retroalimentación con valor hedónico positivo (RA^+) y la ingestión. Si después de la presentación del EI este tiene consecuencias, en forma de una retroalimentación negativa tal como un malestar gástrico inducido por cloruro de litio, que actúe sobre el EI cambiándole el valor hedónico, la respuesta subsiguiente será en sentido contrario a que se venía presentando.

fundamento, implícito o explícito, de un sinnúmero de investigaciones en neurofisiología de la conducta y etología, avalado por una larga trayectoria de evidencias experimentales (para una revisión del origen e inclusión de esta visión en la ciencia actual, véase Lubek & Apfelbaum, 1987).

La polémica sobre la definición de los componentes del condicionamiento aversivo al sabor, es el motivo de la simplificación, hecha anteriormente y mostrado en la Figura 2. Visto de esta manera, si solo se quiere estudiar el recuerdo, como es el caso del presente trabajo, son irrelevantes los mecanismos de adquisición y consolidación, pero el mecanismo de recuerdo puede ser solo uno y el mismo, independientemente del modelo que se elija.

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.

III. *La Corteza Insular de la Rata y su Estudio.*

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 este aprendizaje.

En 1955, Benjamin y Pfafmann 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 adjacente pero distinguiblemente arriba del sulco rinal. Con base en 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 respuestas 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.

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 "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 (fig. 5) comienzan con activación de receptores linguales conectados principalmente con los nervios craneales facial (VII) y glossofaríngeo (IX) y en menor medida por el par craneal vago (X). Estas fibras conectan directamente con la porción anterior del núcleo del tracto solitario 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 esto por el hecho que ratas descerebradas (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 & Norgren, 1978).

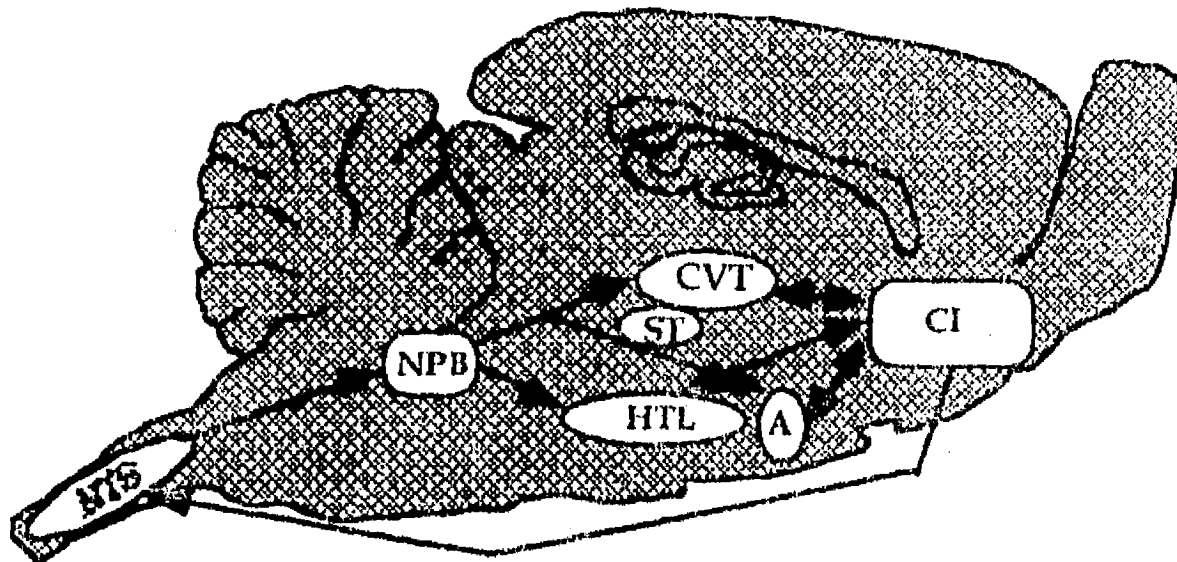


Figura 5. Esquema de las principales aferencias a la corteza insular que median el condicionamiento aversivo a los sabores en ratas, modificado de Kiefer (1985). NTS, núcleo del tracto solitario; NPB, núcleo parabraquial del puente; CVI, complejo ventrobasal del tálamo; ST, núcleo subtalámico; HIL, hipotálamo lateral; A, amígdala; CI, corteza insular.

Las fibras ascendentes que salen del NTS van principalmente al núcleo parabraquial del puente, también conocido como área pontina del sabor (Leonard et al., 1989); en donde comienza a realizarse una cierta integración de los sabores, mostrado por el hecho de que la inactivación temporal de este núcleo no permite el condicionamiento a sabores pero sí su percepción (Buresova y Bures, 1991).

A partir del núcleo parabraquial del puente, las fibras pueden seguir una de dos vías. Uno de los grupos de fibras van a diversas estructuras del cerebro ventral tales como la amígdala central (que parece recibir fibras directamente del NTS) el hipotálamo lateral distal y la sustancia innominata (Norgren, 1974). El segundo grupo de fibras se proyecta al núcleo ventromedial del tálamo, muy cerca de la región lingual. 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 & Wang, 1953). Existe una segunda vía por la cual se puede inducir el proceso emético; 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 & 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 para las 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 & Norgren, 1981). Existen sustancias tales como el cloruro de litio (LiCl) que administradas intraperitonealmente parecen actuar utilizando las dos vías descritas.

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 impedita 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.

IV. Los Implantes de Tejido Neuronal y Modelos de Recuperación Funcional.

La técnica de transplatación de órganos ha sido estudiada desde hace más de un siglo, incluido el tejido nervioso. Esta técnica no sólo 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 se limitaron a describir la capacidad de éstos para mostrar supervivencia en el nuevo medio, con resultados desiguales y difícilmente reproducibles (Björklund & Steveni, 1985a).

En 1969 apareció un trabajo de Raisman que aportó evidencias de que el tejido cerebral en el septum desaferentado 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 esta 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; ésto implicaba que el daño en el sistema nervioso central era anatómicamente irreversible, aunque sí 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 da por sí misma, pero puede ser inducida o acelerada mediante la adición de algún tratamiento a la región dañada, y en estos casos los trasplantes han mostrado una gran utilidad (Dunnett & Bjorklund, 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 (Stenevi, Björklund & Svenggaard, 1976). En breve, el tejido del sistema nervioso central solo es viable como trasplante cuando el donador está en desarrollo, y mejor si es embrionario. Parece ser que existe un tiempo límite de desarrollo durante el cual debe obtenerse el tejido

transplantado. Este tiempo difiere para cada población de neuronas, y parece corresponder al final de la mitosis (Seiger, 1985), aunque Jaeger y Lund (1980) consideran que el éxito del trasplante depende de la capacidad proliferativa de las células del donador. También 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 cerebroespinal del huésped. Existen cavidades naturales, como los ventrículos o la cámara anterior del ojo, que llenan estos requisitos. Alternativamente, se puede elaborar artificialmente una cavidad que reciba al implante; esta cavidad se revasculariza al cabo de un tiempo (generalmente en 15 días) y constituye un sitio adecuado para sostener el crecimiento del tejido, ya que los vasos sanguíneos que recubren la cavidad dotarán al trasplante con el aporte sanguíneo necesario para su supervivencia (Stenevi et al., 1976). 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 &

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

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

Para entender los mecanismos involucrados en la recuperación, deben ser evaluadas cada una de estas contribuciones. En general se postulan tres tipos de mecanismos, no excluyentes uno del otro y de los que hay un gran número de evidencias. 1) el reestablecimiento de conexiones, 2) las interacciones tróficas, y 3) la liberación de hormonas o de neurotransmisores (Björklund, 1991).

La recuperación funcional observada en los distintos modelos no puede ser explicada por uno solo de los mecanismos descritos anteriormente. De hecho en la mayoría, si no es que en todos los casos, el reestablecimiento de una función, es el resultado de la acción de varios factores.

La importancia de cada factor en la recuperación funcional dependerá en última instancia, del modelo experimental que se esté abordando.

Los primeros experimentos examinando la viabilidad funcional de los trasplantes neurales investigaron la ejecución de ratas transplantadas probadas en una variedad de conductas sencillas y cuantificables, que reflejaban el estado de las funciones motoras y neuroendócrinas del animal. Sin embargo, una vez que se ha establecido que implantes neurales podrían influir en conductas incondicionadas sencillas, fué consiguiente la pregunta de que si podrían tener influencia sobre funciones más complejas, en particular aquellas asociadas con centros corticales superiores asociados con aspectos cognositivos.

Este interés en expandir el rango de pruebas conductuales para el análisis de los efectos de los implantes cerebrales surgió durante una época en donde había un interés creciente en las afecciones neuropatológicas relacionadas con la demencia y el envejecimiento. En particular, causó mucho interés la propuesta de una disfunción colinérgica como causa de la disfunción cognoscitiva, por Perry y cols. (Perry et al., 1978) quienes observaron que el decremento en una prueba de función mental, se correlacionaba con un decremento de la actividad

colinérgica en la neocorteza postmortem. Paralelamente, estudios psicofarmacológicos hicieron notar la similitud entre los déficits cognoscitivos inducidos por drogas anticolinérgicas en sujetos jóvenes y los déficits de memoria observados en el envejecimiento (Drachman & Sahakian, 1980). Estas dos líneas de investigación convergieron en la formulación de la "hipótesis colinérgica de la disfunción de memoria geriátrica" que, en su forma mas sencilla, establece que los déficits cognoscitivos, particularmente los de memoria, observados en el envejecimiento y la demencia son atribuibles a un decremento funcional de las neuronas colinérgicas del cerebro basal frontal, que dá origen a la inervación colinérgica de la corteza cerebral (Coyle, Price & DeLong, 1983).

La hipótesis colinérgica ha estimulado gran atención al sugerir que el reemplazo colinérgico pudiera proveer de una estrategia para desarrollar una terapia efectiva para la demencia. Aunque ahora se acepta que la hipótesis colinérgica sobreenfatiza el papel que los sistemas colinérgicos tienen en la patología de la demencia, ha sin embargo estimulado el estudio del papel que juegan las neuronas colinérgicas en la regulación de las funciones corticales (Björklund & Dunnett, 1995).

V.El Estudio de las Funciones de la Corteza Insular Mediante Implantes Cerebrales.

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 & Kooy, 1988). Existe evidencia que la amígdala está particularmente involucrada en las influencias modulatorias de la memoria de aversiones (McGaugh et al., 1990). Existe también evidencia de que la amígdala y la CI están funcional y anatómicamente interconectadas (Escobar, Fernández, Guevara-Aguilar & 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 mecanismos emocionales y motivacionales (Pascoe & Kapp, 1987).

Varios estudios han demostrado que el área de la CI está involucrada en la mediación de aspectos condicionados de la respuesta al gusto, pero no está involucrada 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, las 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 soluciones acidificadas (Kiefer, 1985).

La técnica de los trasplantes cerebrales ha sido extensamente utilizada para producir recuperación funcional conductual después de lesiones del cerebro adulto en los mamíferos. Así, se ha establecido que las neuronas transplantadas pueden diferenciarse y hacer conexiones con el cerebro hospedero (Björklund & Steveni, 1985b; Dunnett & Bjorklund, 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, Fernández, Sánchez, Aguilar-Roblero & Drucker-Colín, 1987). En estos estudios, la posibilidad de recuperación espontánea fué excluída, 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 sólo 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, dejando intactas fibras de paso, no afectaron la adquisición del CAS, mientras que lesiones similares de la CI tienen fuertes efectos disruptivos del CAS (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991).

Los experimentos que involucran transplantes 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 et al., 1991). En este estudio se utilizaron ratas lesionadas en la CI que mostraban impedimento en la capacidad de adquirir el CAS; los animales recibieron transplantes de tejido fetal tomados de la área correspondiente de la CI (homotópicos) y reentrenados a los 15, 30, 45 y 60 días después del transplante. 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-transplante. Estudios de histoquímica utilizando un trazador retrógrado, la 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-transplante 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 estos núcleos es importante para la recuperación inducida por transplantes (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 (Dunnett & Björklund, 1987).

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 γ -amino-butírico (GABA), acetilcolina y glutamato, pero no dopamina; asimismo se encontró que estas rebanadas contenían cantidades

significativas de las enzimas encargadas de la síntesis del glutamato y de la síntesis y degradación de la acetilcolina (López-García, Bermúdez-Rattoni & Tapia, 1990). Al respecto, análisis bioquímicos demostraron que los trasplantes de CI son capaces de liberar GABA, acetilcolina y glutamato en respuesta a una corriente despolarizante. En contraste, los trasplantes de corteza occipital liberaban GABA y glutamato pero no acetilcolina, correlacionándose con estudios en los que los trasplantes 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 trasplantes.

Las implicaciones de esta serie de experimentos con trasplantes son que, para la CI, la recuperación funcional está relacionada con la maduración morfológica y la actividad colinérgica del trasplante. Los mecanismos que utiliza el SNC para la comunicación celular, son principalmente mediados por mensajeros químicos, tales como los neurotransmisores. Existen además de los neurotransmisores una gran variedad de moléculas encargadas de la comunicación celular, entre las 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 & Manthorpe, 1988). El término trófico proviene de la primera idea de que estos factores servirían como "alimento" (trofos=comida) para el sustento de las células, aunque ahora se sabe que en realidad realizan funciones 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., 1988), que señala que las neuronas del SNC adulto dependen de factores neurotróficos para su mantenimiento, función y reparación, por lo que las deficiencias de factores neurotróficos endógenos ocasionan disfunción, hipotrofia y degeneración. La administración exógena de factores neurotróficos previene, o inclusive corrige daños producidos por lesiones degenerativas o traumáticas. 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 señaladas 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, Dunnett, Hefti y Will (1985) encontraron que el factor de crecimiento neuronal (NGF, por sus siglas en inglés) incrementa la actividad de la colinacetil-transferasa en las neuronas colinérgicas (que contienen acetilcolina) transplantadas en el hipocampo desaferentado, pero no tiene efectos sobre los implantes colocados en el hipocampo intacto. El implante de glándula sublingual de ratón (tejido rico en NGF) en la fimbria-fornix previamente lesionada, tiene efectos tróficos sobre las neuronas colinérgicas axotomizadas (Springer & Loy, 1985). Como se ha mencionado, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que los 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 et al., 1987), esta recuperación se presenta hasta los 45 días post-implante, pero no se observa una recuperación ni a

los 15 ni 30 días (Fernández-Ruiz et al., 1991). Sin embargo, si el implante se realiza en combinación con NGF se puede observar una recuperación inclusive a los 15 días post implante (Bermúdez-Rattoni et al., 1992). Esta observación fué hecha de la siguiente manera: en un experimento para evaluar el papel del NGF sobre la habilidad de adquisición de CAS inducida por transplantes, 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 protéica, fisiológicamente inerte y reabsorbible por el sistema nervioso) adicionado con NGF, otro recibió transplantes de CI fetal con NGF, un tercer grupo recibió gelfoam con el vehículo en el que se diluiría el NGF y un grupo que recibió los transplantes de CI fetal con vehículo. Un grupo adicional 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-transplante, respectivamente.

Los resultados conductuales mostraron que los grupos control presentaron aversiones robustas en los tres tiempos post-transplante. El grupo con transplante cortical con NGF mostró una recuperación significativa en la habilidad para adquirir aversiones al sabor en los tres tiempos post-

transplante comparado con los controles. El grupo con transplantes corticales con vehículo (sin el NGF) no mostró 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 NGF 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 NGF con transplantes de corteza insular acelera la recuperación de la habilidad para adquirir un condicionamiento aversivo a los sabores. Es importante notar que estudios previos habían mostrado que en ausencia de NGF los transplantes de CI solo comienzan a inducir recuperación hasta los 30 días después de la implantación, por lo que los efectos del NGF parecen acelerar la recuperación.

Hasta hace poco tiempo, los 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 & Escobar, 1989; Garcia, Lasiter, Bermúdez-Rattoni

& Deems, 1985; Lasiter & Glanzman, 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 el condicionamiento aversivo a los sabores así como de 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. 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, fue afectada por lesiones amigdalinas. Estos resultados constituyeron 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 & McGaugh, 1991).

En otra serie de experimentos se ha utilizado la técnica de lesiones reversibles mediante la aplicación de el bloqueador neural tetrodotoxina (TTX). La TTX actúa mediante el bloqueo selectivo de los 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, después de los cuales se restaura la función normal. En éstos experimentos (Bermúdez-Rattoni, Introini-Collinson & 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, Introini-Collison 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 através 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 & 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 NGF o sin él y fueron entrenadas 20 días después en la tarea de prevención pasiva, encontrándose que los animales control y los animales con implantes con NGF 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 de cruce al lado reforzado (Escobar, Jiménez, López-García, Tapia & Bermúdez-Rattoni, 1993)

OBJETIVOS.

Objetivo general:

Evaluar los efectos que diferentes implantes en la corteza insular lesionada tienen sobre la habilidad de recordar un condicionamiento aversivo al sabor (CAS), y compararlo con los efectos que estos implantes tienen sobre la capacidad de aprender nuevas tareas.

Objetivos específicos:

En un primer experimento se evaluó los efectos que tendrían implantes de tejido homotópico (corteza insular fetal) sobre la capacidad de recordar aversiones adquiridas antes de la lesión, y compararlo con implantes de tejido cortical similar, pero obtenido de una región del cerebro fetal diferente (corteza occipital). Las pruebas conductuales se llevaron a cabo a partir de los 45 días después de la implantación debido a que este es el tiempo reportado como necesario para observar recuperación de la capacidad de aprender las tareas de CAS y prevención pasiva.

En un segundo experimento se pretendió evaluar si la adición de factor de crecimiento neuronal (NGF) a los implantes homotópicos tiene un efecto diferencial sobre el recuerdo de CAS adquirido antes de la lesión, comparado con tejido no suplementado, o con NGF sólo, embebido en un implante de gelfoam. En este caso la evaluación conductual se llevó a cabo a los 15 días post-implante, que es el tiempo en el que se ha reportado recuperación de la capacidad de aprender CAS en ratas con implantes adicionados con NGF.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES Y RESULTADOS.

**Long Term Memory Retrieval Deficits of Learned Taste
Aversions are Ameliorated by Cortical Fetal Brain Implants.**
(Manuscrito enviado a publicación a la revista Behavioral
Neuroscience)

**Christopher E. Ormsby, Víctor Ramírez-Amaya and
Federico Bermúdez-Rattoni.**

Keywords: Conditioned Taste Aversion, Neural Transplants,
Learning, Nerve Growth Factor, Graft Induced Recovery.

Abstract.

Previous studies have shown that homotopic cortical fetal implants induce recovery in the ability to acquire a conditioned taste aversion (CTA) in insular cortex (IC) lesioned rats. The purpose of this study was to test the effects that these implants have on the ability to retrieve the memory for a previously acquired CTA. Several groups of rats were trained for a CTA and four days later lesioned in the IC, and implanted with different fetal cortical tissues, treated or untreated with nerve growth factor (NGF); and then tested for recall at either 45 or 15 days later, and then retrained and tested with a different taste. Results showed that all implanted animals recovered the retrieval of CTA's learned before IC lesions; however, only the homotopic IC implants at 45 days or NGF-supplemented at 15 days, induce recovery of the ability to learn CTA. The results suggest that the brain mechanisms for recovery of memory functions are different from those of learning abilities.

The functional viability of fetal neuronal grafts on the performance of simple behaviors has been well established. The rationale behind the interest in widening the range of behaviors studied with grafts and their effects on cognitive function, also lies in an expanding interest in cognitive dysfunction, in particular dementia (Dunnett, 1994). The observation that the dementia of the Alzheimer type was correlated with a decline in the cortical cholinergic levels (Coyle, Price & DeLong, 1983), gave rise to the possibility of cholinergic replacement by fetal grafts in order to restore the cognitive deficits. In the last few years there has been a growing interest in studies involving cholinergically rich and cholinergically poor grafts and their effects on cognitive function, not only in view of alleviating deficits associated with dementia, but also to study the repair and normal function of cognitive processes associated with a variety of brain sites, in particular the neocortex, basal ganglia, and hippocampus (Dunnett, 1994).

In the study of the neurobiology of learning and memory, it is important to note that most authors consider learning (the associative process in itself) as a phenomenon different from memory (the retention and retrieval of the learned behavior), and the latter is also frequently divided in two distinct phases or stages, one of short temporal duration,

and one much longer or even permanent (Kesner, 1991). Each of these stages has its own characteristics, and can be differentially affected with behavioral and physiological manipulations. In general terms, lesions or manipulations of the central nervous system, can be seen as having an anterograde amnesic effect, when the manipulation impairs normal acquisition of new learning, and a retrograde amnesia, where the subject cannot retrieve information learned beforehand, prior to the manipulation (Verfaellie & Cermak, 1991).

One model that has been widely used in the study of learning and memory processes is the conditioned taste aversion (CTA) (Garcia, Lasiter, Bermúdez-Rattoni & Deems, 1985). In this procedure, rats are exposed to a novel flavored solution, and a few minutes later received an induced gastric malaise. As a result, when the flavored solution is presented again, animals reduce their consumption with respect to the acquisition trial and with respect to the amount of water they were ingesting on previous days. The anatomical substrates of the CTA have been described and established with accuracy (Kiefer, 1985), and these include the gustatory portion of the insular cortex (IC) as a higher projection site for taste-visceral information. The gustatory portion of the IC is the primary projection site for taste sensation (Patton, 1950), but contrary

to all other cortical sensory areas, the IC is not necessary for taste perception nor discrimination, since these processes seem to take place in brainstem and pontine areas (Braun, Lasiter & Kiefer, 1982; Norgren, 1984; Yamamoto, 1993). Even though the unconditioned responses to taste do not depend on the integrity of the IC, this area is responsible for the conditioning of tastes that have been associated in a CTA paradigm. Lesions of the gustatory portion of the IC induce anterograde and retrograde amnesia for CTA as shown by deficits in the ability to acquire (Benjamin & Pfaffman, 1955) and retain CTA's (Braun et al., 1982). More recently, the IC has been involved in other aversive learning such as inhibitory (passive) avoidance and Morris water maze (Bermúdez-Rattoni, Introini-Collinson & McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991), since the lesion or reversible inactivation of this area induce deficits in both of these learning tasks.

Many studies of insular cortical mediated behaviors have used fetal brain grafts, and have shown that these grafts ameliorate anterograde amnesia and are able to recover the ability to acquire new CTA's (Bermúdez-Rattoni, Fernández, Sánchez, Aguilar-Roblero & Drucker-Colín, 1987) or the inhibitory avoidance task (Escobar, Russell, Booth & Bermúdez-Rattoni, 1994) after lesioning of the IC.

Furthermore, the recovery of both these tasks have been directly correlated with re-establishment of normal levels of acetylcholine by the grafts (López-García, Fernández-Ruiz, Bermúdez-Rattoni & Tapia, 1990; Russell, Escobar, Booth & Bermúdez-Rattoni, 1994); additionally, a time dependent graft induced recovery was shown, in that at 15 days post-graft no recovery was shown in any of the two paradigms, but recovery was seen at 45 and 60 days post-grafting (Escobar, Fernández, Guevara-Aguilar & Bermúdez-Rattoni, 1989; Fernández-Ruiz et al., 1991). The grafting also showed a tissue specific recovery, since only grafts taken from the fetal insular lobe of the fetuses induced it, and not tissue taken from the occipital lobe (Escobar et al., 1989). Both the time dependent and tissue specific recoveries were shown to correlate with choline acetyltransferase activity, suggesting a cholinergic involvement. With this in view, a series of experiments were carried out to examine the possible role that nerve growth factor (NGF) could have on graft mediated recovery of CTA and inhibitory avoidance, since NGF has been shown to produce in vitro sprouting of cholinergic cells (Varon, Hagg, Vahlsing & Manthorpe, 1988) and at least partial compensation for effects of brain damage, restoring the pattern of cholinergic innervation and producing concomitant improvements in some behaviors (Williams et al., 1986). These experiments with NGF (Bermúdez-Rattoni et

al., 1992) showed that supplementing fetal IC grafts with NGF, reduced the time necessary to observe recovery of the ability to acquire a CTA or an inhibitory avoidance task, to only 15 days after implantation. This acceleration of recovery was not shown in animals that received only vehicle supplements or blocks of Gelfoam embedded in NGF alone, demonstrating that the recovery was due to an action between the implant and NGF (Bermúdez-Rattoni et al., 1992). These results contrast with others in which NGF alone was able to induce recovery of cognitive functions (Hefti, 1986).

The studies mentioned above have only focused on the recovery from lesion-induced anterograde amnesia, but scarce information is available on the induction and recovery from retrograde amnesia. Thus, the present work is aimed at studying the effects that fetal brain implants have on lesion-induced retrograde amnesia, in particular on the ability to recall taste aversions learned previously to the IC lesions.

Experiment 1.

The following experiment was made to test the possibility that homotopic or heterotopic neural fetal grafts, are able to recover the ability to remember CTA's acquired before insular cortex lesions.

Subjects:

Twenty-nine male Wistar rats were used for this experiment with a range in weights between 262-320 g, at the beginning of the procedures. Two additional 15-day-pregnant Wistar rats served for fetal tissue donors. The animals were housed individually with water and food ad libitum, except during the CTA procedure, as indicated in the General Procedures section. The housing room was kept on an inverted 12:12hr light-dark cycle (lights off at 9:00 a.m.) and all behavioral procedures were carried out during the first 6 hrs of the dark cycle.

General Procedure:

After a two week acclimation period all animals were trained to a conditioned taste aversion to saline taste. The animals were water deprived for 24 hr after which they were presented for 10 min each successive morning (10 a.m.) a graded test tube fitted with a drinking spout and filled with distilled water, and fluid intake was measured with a 0.5 ml precision. An evening 10 min water session was also given daily (at 6:00 p.m.). Twenty min before each morning drinking session the food was removed from the cages and

given back 20 min after drinking. After all animals had obtained a stable base line of water intake (6 days) they were all presented in the morning drinking session with a 0.1% saccharin solution in their drinking test tubes for 10 min. Twenty min after this the animals were injected intraperitoneally with a lithium chloride (LiCl) solution (0.4M, 127mg/kg of body weight), completing this way the acquisition phase of the CTA. Water and food were placed again ad libitum.

To allow consolidation of the CTA, four days after the CTA saccharin acquisition were allowed before lesioning, all animals except an intact control group (CON, n=5) received insular cortex lesions. All lesions were performed bilaterally. The lesions were carried out by placing each animal under pentobarbital anesthesia (70 mg/kg of body weight) and mounting it on a Kopf stereotaxic instrument. The tip of a stainless steel dental needle (30 Ga) was surgically and stereotaxically placed in the insular cortex coordinates (Ap +1.2mm, L \pm 5.5mm, DV -6.5mm, from bregma, incisor bar at -4.5mm; according to Paxinos and Watson (1982). The needle was connected through a polyethylene tube (PE-10, i.d. 0.46mm) to a 10 μ l Hamilton microsyringe mounted on an automated microinjector. The needle, tube and syringe were back filled with a 10 μ g/ μ l solution of N-methyl-D-aspartic

acid (Sigma Chem. Co.; in phosphate buffer 0.1M, pH 7.4). Once the needle was in place, the lesions were induced by the injection of 0.8 μ l of the solution over a 2 min period, and kept in place for an additional 3 min to allow diffusion. The needle was then removed and the animals were sutured and allowed to recover.

After 8 days post-operation, the lesioned animals were divided in three groups as follows: One group was to receive fetal insular cortex grafts (group ICx, n=9) in the lesion site, another received fetal occipital cortex grafts (group OccCx, n=8) and a third one remained lesioned (group Lx, n=7). The control group (CON, n=6) still remained intact. To obtain the fetal tissue, 15-day-old fetuses were removed from the uterus of pregnant anesthetized rats, the heads were placed under a stereoscope and the brains removed and placed in sterile saline. The fetal insular or occipital cortices were then dissected. The insular cortical fetal region was considered to be an area spanning 1.5mm in front and 1.5mm behind the middle cerebral artery, and 2mm dorsal from the rhinal sulcus (Bermúdez-Rattoni et al., 1987). Much care was taken to include only cortical tissue, sparing the underlying caudate-putamen tissue. The fetal occipital cortex was considered as the most caudal cortical region starting 2mm lateral to the sagittal midline and extending 3mm from this

point. Blocks of tissue of the same size as the IC grafts were taken from this area. The dissected blocks of tissue were then placed in different plates with sterile saline and suctioned through a 100 μ l Hamilton microsyringe and allowed to precipitate (approximately 2 min). The lesioned animals to be implanted were anesthetized again and held in the stereotaxic apparatus, and an incision made. The syringe was then placed in a manual R-4000 Kopf microinjector mounted on the stereotaxic instrument, and the tip of its needle placed in the insular cortex coordinates described previously. The tissue was injected with the saline until 6 μ l were advanced, taking 3 min to complete the injection, and the syringe was kept in place for an additional 10 min to allow diffusion. Animals were then sutured and allowed to recover.

Forty five days post-grafting, which is the time reported as necessary to allow in order to observe a recovery of acquisition abilities in homotopic implanted animals (Fernández-Ruiz et al., 1991), all animals were tested for retention of the CTA to saccharin. Five days prior to the testing day, all animals were water deprived for 24 h and a base line of water consumption taken for the next 5 days, after which, in the morning session the water was substituted for saccharin solution and consumption measured, completing this way the retention test for the CTA for saccharin. In order

to train the animals to a new CTA to ascertain the effects of the treatments on newly learned aversions, the base line of water consumption was taken for three more days, and on the fourth the water of the morning session was substituted for a 0.15M sodium chloride solution, followed 20 min later by an intraperitoneal injection of LiCl as described. The base line of water was measured for two more days, and on the third the water was again substituted for the saline solution and its consumption measured, finishing the test for the CTA to saline. Water and food were then kept ad libitum.

In order to have a different behavioral measure of learning recovery, all animals were trained two days after the last CTA test in the inhibitory avoidance learning task. The procedure was modified from McGaugh, Introini-Collison and Nagahara (1988). It was carried out in a 25x25x70 cm acrylic box, divided in two compartments by a sliding door. One compartment was indirectly illuminated by a 60W light bulb and the other was dark and had a two-plate metal floor connected to a Grass electric stimulator. Training consisted in placing each animal in the illuminated compartment for 20 sec with the door closed, after which the door was opened and once the animal would cross all four paws, the door was closed and a 0.7mA electric shock was delivered for 3 sec through the metal floor. The door was then risen and the

animal was let to return to the illuminated compartment and the door again was closed. The procedure described was carried out repeatedly until the animal reached a criteria of latency of 80 sec without crossing into the dark compartment, after which the door was lowered and the animal removed to its home cage. The test (retention) was carried out 24 h later, and consisted in placing the animal in the illuminated compartment for 20 sec with the door closed, opening it, and registering the latency to cross to the dark compartment. In this case the door was let open and the time the animal spent in each compartment during a 600 sec interval was registered.

After the behavioral tests were finished, all operated animals (lesioned or grafted) were given an overdose of anesthesia and perfused through the left ventricle of the heart and the ascending aorta with physiological saline followed by a 4% paraformaldehyde solution in phosphate buffer. The brains were then removed and kept in a 20% sucrose solution for 3 days, after which they were cut in 45 μ thick serial coronal slices, mounted, and stained for either Nissl staining, or for Acetyl cholinesterase histochemistry, using a modified protocol from Paxinos and Watson (1982). Camera lucida drawings of the lesions or of the grafts were made on schematic representations of coronal sections (data not shown). Much care was taken to follow the insular cortex

grafting procedures described in previous experiments described elsewhere (Diaz-Cintra et al., 1995; Escobar et al., 1989; Fernández-Ruiz et al., 1991; López-García et al., 1990), in order to be able to extrapolate the more extensive histological findings of those works with the present ones.

Results:

Histological analysis showed that all animals had bilateral grafts, and that these were larger than the lesion area (as compared to the Lx group) and had a tendency to grow through the passage of the implanting injector (see Fig. 1 for photographs of the implants). No obvious difference was detected between the ICx and OccCx groups as seen on both staining techniques. Lesions and grafts occupied the majority of the insular cortex on either side.

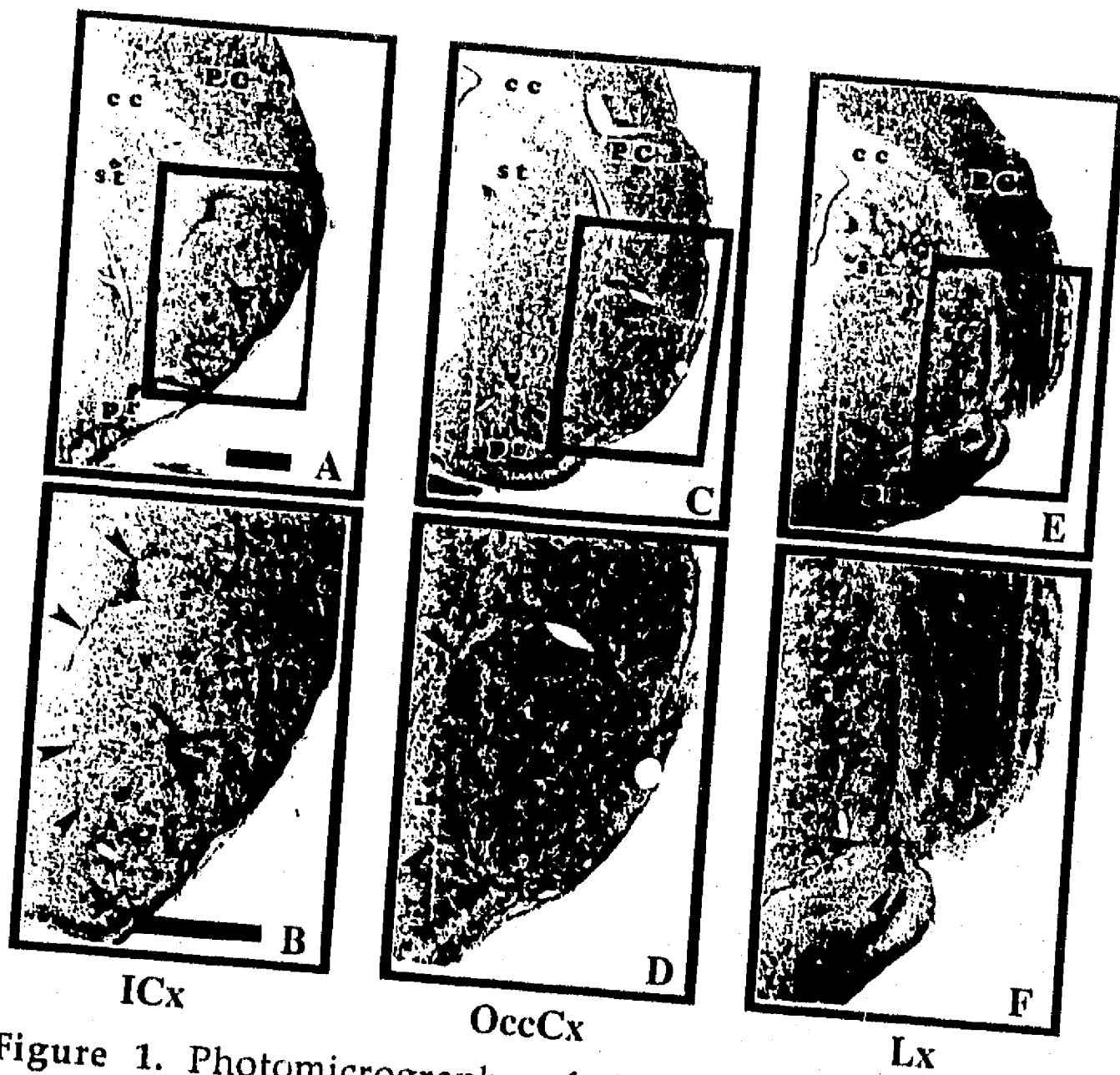


Figure 1. Photomicrographs of the histological slices of Experiment 1 with Nissl staining. The photographs on the top row were taken originally at 2x, the ones on the bottom row are 4x amplifications of the rectangles drawn on the top photographs. Panels A and B: insular fetal cortex grafted into the adult lesioned insular cortex (homotopic, group ICx). C and D: occipital fetal cortex grafted into the adult lesioned insular cortex (heterotopic, group OccCx). E and F: Lesioned area as seen in group Lx. Abbreviations: cc, corpus callosum; st, striatum; pr, piriform cortex; PC, parietal cortex. Arrows on bottom row (B, D) show the limit between host and graft or encircle the lesioned area (F). Black bars on bottom right of panels A and B represent 1mm.

The statistical analysis for the liquid consumption was carried out by one-way ANOVA, and post hoc Scheffe analysis where appropriate. The values for the inhibitory avoidance times were analyzed nonparametrically due to its ordinal variable nature, by Kruskal-Wallis H test, and Mann-Whitney U test for specific two group comparisons.

The base line of water consumption and saccharin consumption during the acquisition of the CTA were similar in all groups (mean Base Line =16.25ml, mean Acquisition =16.12ml) with no differences among them, which was to be expected since no different experimental conditions were applied. During the base line previous to the retention test a slight, but non significant, decrease in the intake was detected in all experimental groups with respect to the control (CON; mean Base Line exp=14.6ml, mean Base Line con=16.52). Nevertheless, to correct for individual base line drinking, the values of the test for the CTA taste stimulus is expressed as a percentage of the base line of water (Dugas-du-Villard, Her & MacLeod, 1981), taking the arithmetical mean of the previous two morning sessions as 100%. Figure 2, panel A, shows the results for the retention test for the saccharin at 45 days post grafting. The ANOVA showed that significant differences existed among groups ($F(3,28)=5.43$, $p<0.05$). As expected, the CON group showed a marked aversion to saccharin, as

expressed by the low percentage of consumption with respect to the base line. Both grafted groups also showed aversion to the saccharin, with no significant differences with the control or amongst them when analyzed post hoc. The group that remained lesioned (Lx), however, did not show an aversion to saccharin, differing significantly with the CON group ($p < 0.01$) and also with both grafted groups (ICx, $p < 0.05$; OccCx, $p < 0.01$).

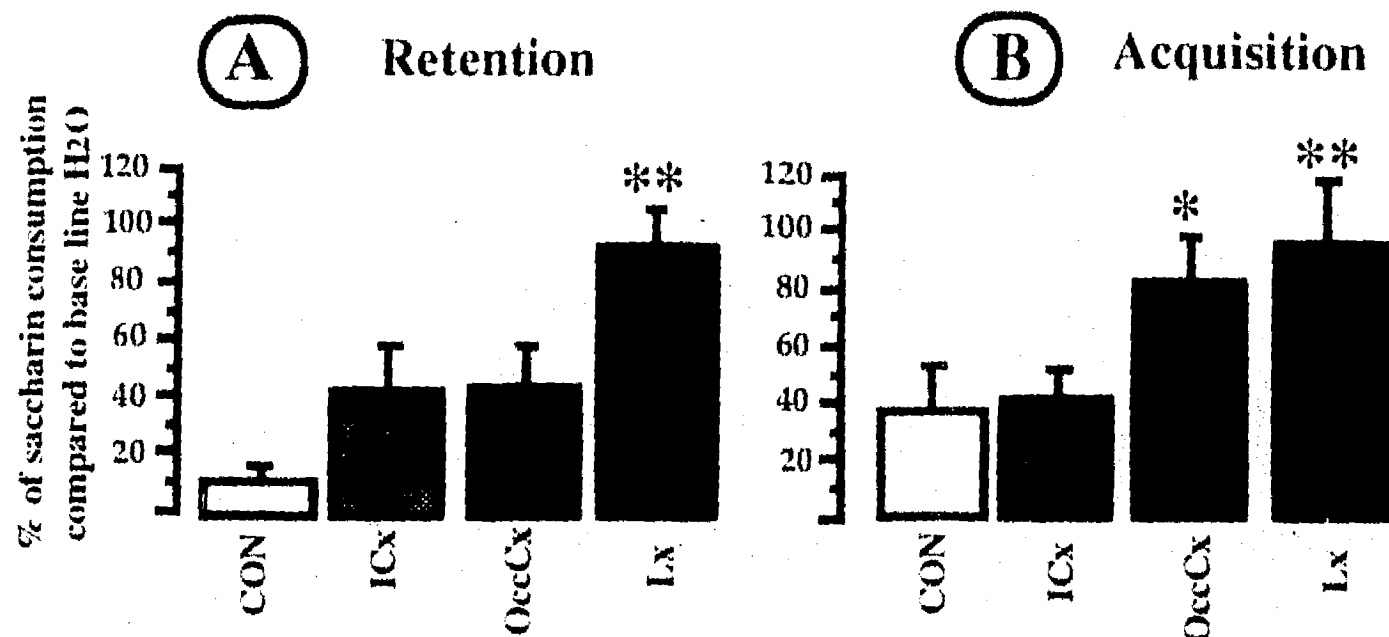


Figure 2. Experiment 1. Panel A: retention test for the CTA to saccharin taste acquired before lesioning, at 45 days post-implantation. Panel B: acquisition test for the new CTA to saline taste at 52 days post-implantation. Vertical axis shows the mean percentage of saccharin solution intake (\pm standard error of mean) as compared to each animal's water base line consumption (see text in Results section of Experiment 1 for details). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the control (CON) group.

Figure 2, panel B, shows the results for the acquisition test for the saline taste at 52 days post grafting. The ANOVA showed that significant differences existed among groups ($F_{(3,28)}=7.89$, $p<0.01$). Again as expected, a marked aversion to saline was shown by the CON group, with a low percentage of consumption with respect to the base line. The homotopic grafted group (ICx) also showed aversion to the saline taste, with no significant differences with the control when analyzed post hoc. The group that received heterotopic tissue (OccCx) and the one that remained lesioned (Lx), did not show an aversion to saline, differing significantly with the CON group (OccCx, $p<0.01$; Lx, $p<0.01$) and also with the homotopic grafted group (OccCx, $p<0.05$; Lx, $p<0.01$).

The results for the inhibitory avoidance learning are shown in Figure 3. The ICx group had learned the task as shown by the high latency to cross into the dark compartment, and a high stay in the lit compartment similar to the control group. The Kruskal-Wallis test showed differences between groups ($p<0.05$). The OccCx and Lx groups had lower values for latency and stay in lit compartment and the Mann-Whitney U test showed that they were unable to learn the task, as showed by significant differences with the

control (CON) group (OccCx: Latency, $p < 0.05$, Stay, $p < 0.05$; Lx: Latency, $p < 0.05$, Stay: $p < 0.01$).

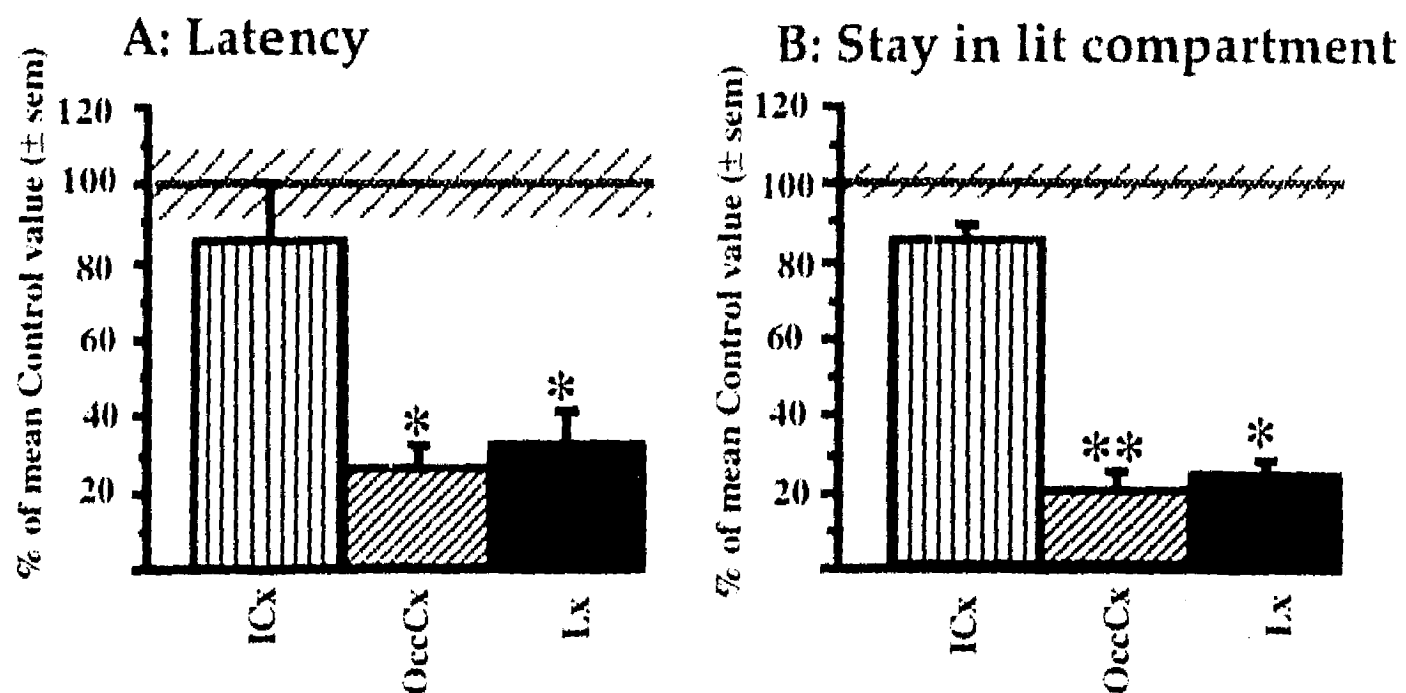


Figure 3. Experiment 1. Inhibitory avoidance learning test at 54 days post-implantation. Panel A: latency to cross into dark (shock) compartment. Panel B: accumulated stay in lit (safe) compartment in a 600 sec period. For the purpose of comparison of this graph with Fig. 6 of Experiment 2, the values for each experimental group were transformed to a percentage of the mean value of the control (CON) group, and are shown in the vertical axis (\pm standard error of mean, SEM). The statistical analysis was made with the raw data. The control value (100%) is shown as the horizontal line, with the \pm SEM of the CON group depicted as the striped area around it. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the control (CON) group.

These results show that, as expected, animals with homotopic implants (fetal IC) in the NMDA-lesioned IC were able to learn a new CTA when it is presented 52 days post implantation, shown by the low saline taste intake (Fig. 2B) and not so the animals implanted with heterotopic tissue (fetal occipital cortex), replicating previous results with electrolytic lesions (Escobar et al., 1994). Surprisingly, the ability to remember CTA's established before the lesion was restored in both implanted groups, regardless of the origin of the fetal tissue. The animals that remained lesioned did not recover spontaneously either the ability to remember (Fig. 2A) or to learn (Fig. 2B) a new CTA. It is noteworthy that a dissociation between the ability to learn and to recall was found in the OccCx group.

The inhibitory avoidance task showed that only the homotopic grafts were able to induce recovery of the ability to learn this task, showing the same tissue specificity that the CTA task with a new taste had shown, which is in direct concordance with results described elsewhere (Escobar et al., 1994).

Experiment 2.

The following experiment was made in order to determine the differential effects that fetal brain implants supplemented with or without NGF have on the ability of remembrance of CTA's acquired before lesions of the Insular Cortex.

Subjects:

Forty-three male Wistar rats were used in the same conditions and characteristics as in the Experiment 1, with a range in weights between 258-319 g, at the beginning of the experiment. Additionally two 15-day-pregnant Wistar rats served for fetal tissue donors.

General Procedures:

All animals were trained in the acquisition of CTA to the flavor of saccharin as described in the procedures of Experiment 1. Four days later all animals except an intact control group (CON, n=10) were IC lesioned with micro injections of NMDA as described before. Eight days later, the lesioned animals were divided into 4 groups. One group was

to receive fetal IC supplemented with NGF (group IC+NGF, n=8); another, the implants with the NGF vehicle alone (IC-Veh, n=8); the other 2 groups received instead of fetal tissue small blocks of Gelfoam (Upjohn), approximately of the same volume as the implants, embedded with (group GFM+NGF, n=7), or without (group GFM-Veh, n=10) the NGF.

The implantation of the fetal tissue was carried out by the dissection of the fetal IC as described before, but the obtained tissue was placed in a Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) instead of saline. For the IC+NGF group, 10 μ g/ml of NGF (Sigma Chem. Co., mouse 7s fraction) was added. Each IC tissue was back-filled with medium into a 100 μ l Hamilton microsyringe, and 6 μ l of the tissue plus medium was stereotaxically injected into the lesioned IC of anesthetized rats. The needle was kept in this position for an additional 10 min to allow diffusion.

The implantation of the Gelfoam was made by cutting a 3 x 2 x 2 mm block and placed in the medium for 30 sec, in the case of the GFM+NGF group the medium was supplemented with NGF. The blocks were then placed in the trephine and were pushed downwards to the lesioned IC with a steel wire (0.8 mm thick) attached with a stopper at the required dorsoventral coordinate. A version of this procedure has proven that when the medium was supplemented with

NGF the blocks promoted survival of neurons in the septal transection lesion model (Hefti, 1986).

After the implantation, animals were left to recover for 12 days, after which a second base line of water consumption measurement was begun, and three days later, on day 15 post-implantation, which is the time reported as necessary to allow for recovery of acquisition abilities in NGF supplemented grafts (Escobar et al., 1994), all animals were tested for the retention of the CTA for saccharin acquired before the lesion, substituting the morning water intake with the saccharin solution and measuring the consumption. The animals were then given a two trial CTA training to the novel flavor of 0.2 M saline. The base line of water consumption was measured for three more days and on the fourth water was substituted for saline, and an ip injection of LiCl solution, this procedure was given again after two more days of water. After the training procedure, animals were tested for retention of the CTA to saline, at 22 days post-implantation.

After the retention test for the CTA to saline animals were again given water freely, and trained two days later in the inhibitory avoidance task, tested for retention 24 h later. The animals were then perfused and histologies were carried out as described in the Experiment 1.

Results:

Photographs taken from the histologies are shown in Figure 4. As in Experiment 1, The grafts grew larger than the original lesioned area, and tended to grow through the implantation groove left by the implantation canulae. Again no obvious differences were observed between implanted groups (IC+NGF vs. IC+Veh). Both groups implanted with Gelfoam showed bilateral lesions and in some cases (4 rats unilateral, 1 bilateral) the characteristic reticular pattern of the Gelfoam was observed inside of the lesioned area.

The base line of water consumption before the first CTA acquisition were very similar for all groups, also the saccharin consumption during acquisition (mean Base Line= 14.85 ml, mean Acquisition= 16.08 ml; for all animals), which was to be expected since no different experimental conditions were applied.

The results of the retention test to the CTA to saccharin 15 days post-implantation are represented in Figure 5, panel A. As in Experiment 1, the consumption values were transformed to the arithmetic percentage of the base line consumption. The control group (CON) showed a strong aversion to saccharin, as shown by the low percentage of

consumption with respect to its base line. A one-way ANOVA showed that there was a significant difference between groups ($F(5,43) = 5.67, p < 0.05$). In a Fisher's post hoc analysis, the effect between groups was shown to be the following: Both groups that received fetal IC tissue, with (IC+NGF) or without (IC-Veh) the nerve growth factor showed similarly an aversion to saccharin slightly weaker, but not significantly different. The two

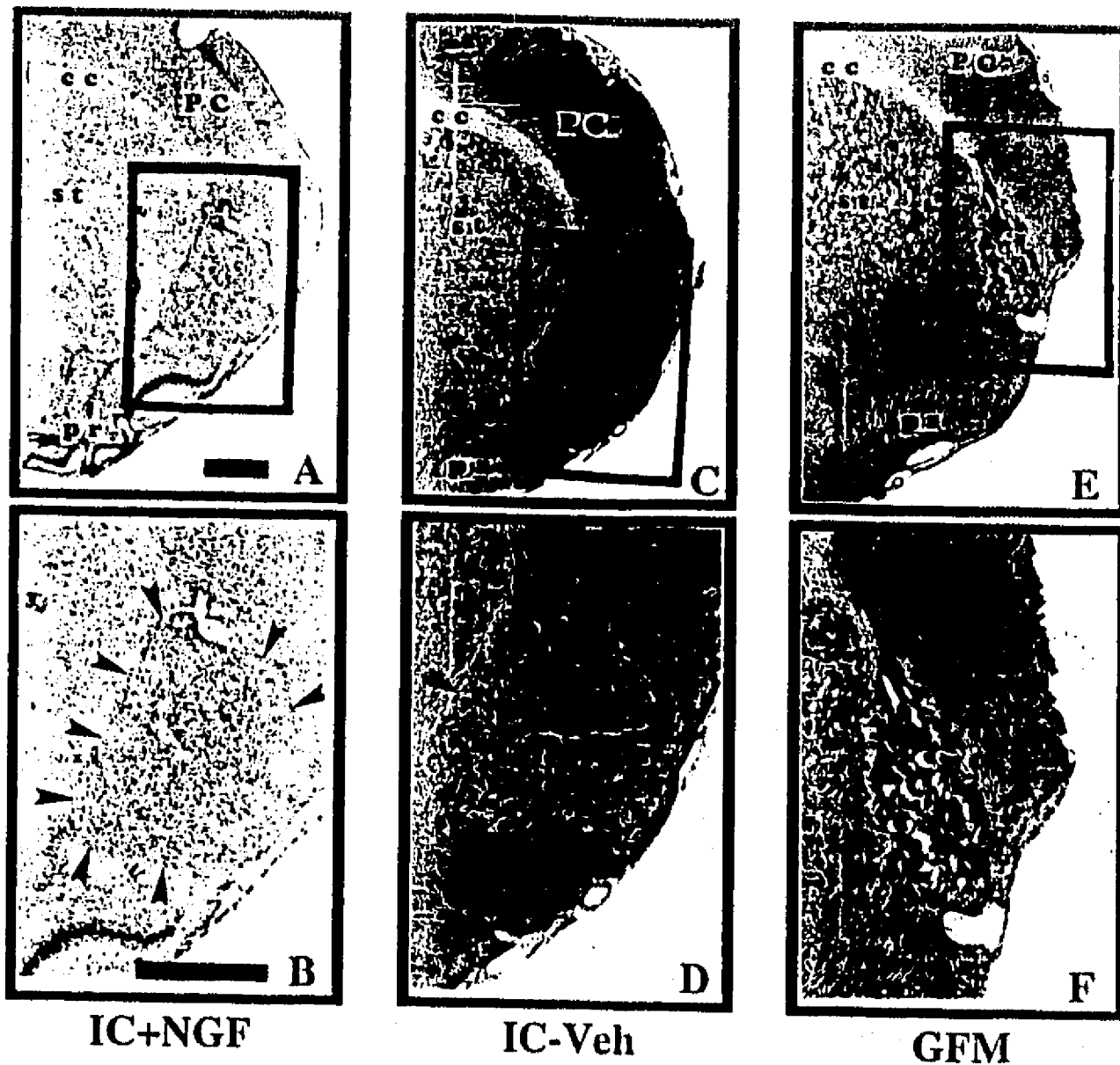


Figure 4. Photomicrographs of the histological slices of Experiment 2 with Nissl staining. The photographs on the top row were taken originally at 2x, the ones on the bottom row are 4x amplifications of the rectangles drawn on the top. Panels A and B: insular fetal cortex supplemented with NGF grafted into the adult lesioned insular cortex (group IC+NGF). C and D: non-supplemented insular fetal cortex (group IC+Veh). E and F: representative example of Gelfoam implants (group GFM+NGF). Abbreviations: cc, corpus callosum; st, striatum; pr, piriform cortex; PC, parietal cortex. Arrows on bottom row (B, D) show the limit between host and graft or encircle the Gelfoam area (F). Black bars on bottom right of panels A and B represent 1mm.

groups with Gelfoam implants supplemented with (GFM+NGF) or without (GFM-Veh) NGF showed a statistically impaired aversion to the saccharin as compared to the control (GFM+NGF $p < 0.01$ vs. CON; GFM-Veh $p < 0.01$ vs. CON).

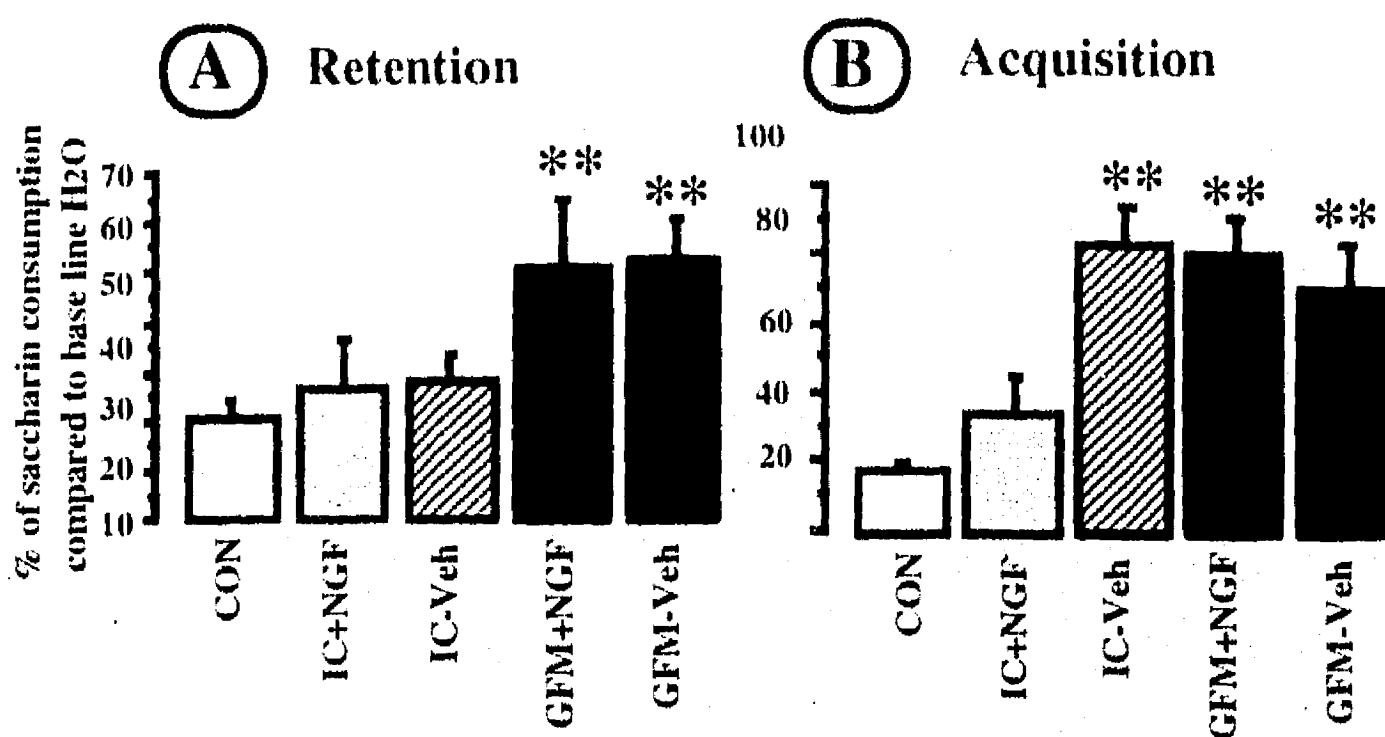


Figure 5. Experiment 2. Panel A: retention test for the CTA to saccharin taste acquired before lesioning, at 15 days post-implantation. Vertical axis shows the mean percentage of saccharin solution intake (\pm standard error of mean) as compared to each animal's water base line consumption (see Results section of Experiment 1 in text for details).

** $p < 0.01$ compared to the control (CON) group.

Figure 5, panel B, shows the results for the test for the saline taste after two acquisitions, at 22 days post grafting. Significant differences were shown to exist by the ANOVA among groups ($F(3,28)=6.97$, $p<0.01$). A marked aversion to saline was shown by the CON group, with a low percentage of consumption with respect to its base line. The insular cortex grafted group supplemented with NGF (IC+NGF) showed aversion to the saline taste, with no significant differences with the control when analyzed post hoc. The group that received non supplemented tissue (IC-Veh) and the two groups that received the Gelfoam implants, did not show an aversion to saline, differing significantly with the CON group (GFM+NGF $p<0.01$; GFM-Veh $p<0.01$) and also with the NGF supplemented grafted group (GFM+NGF $p<0.05$; GFM-Veh $p<0.05$).

The inhibitory avoidance results are represented in Figure 6. The IC+NGF group learned the task as shown by a high latency to cross into the dark compartment, and a high stay in the lit compartment similar to the control group. The Kruskal-Wallis test showed differences between groups ($p<0.01$). The group implanted with vehicle and the groups that received gelfoam had lower values for latency and stay in lit compartment and the Mann-Whitney U test showed that they were unable to learn the task, as shown by significant

differences with the control (CON) group (In latency: IC+Veh, $p < 0.01$; GFM+NGF, $p < 0.01$; GFM+Veh, $p < 0.01$. In stay: IC+Veh, $p < 0.01$; GFM+NGF, $p < 0.01$; GFM+Veh, $p < 0.01$). The group that received gelfoam with vehicle was significantly different in both latency and stay with the groups GFM+NGF and IC-Veh (p 's < 0.05).

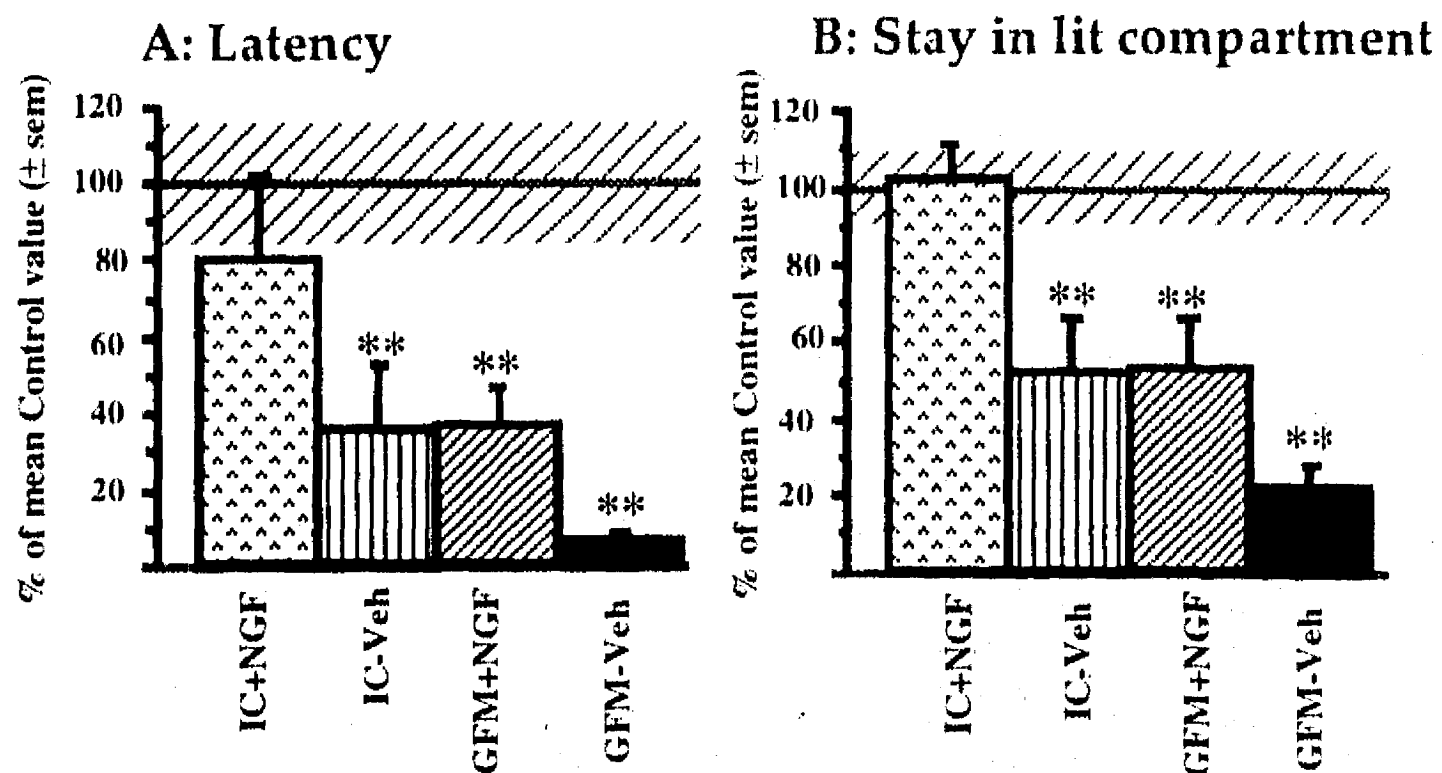


Figure 6. Experiment 2. Inhibitory avoidance learning test at 24 days post-implantation. Panel A: latency to cross into dark (shock) compartment. Panel B: accumulated stay in lit (safe) compartment in a 600 sec period. See label on Fig 3 for explanation of the y axis. ** $p < 0.01$ compared to the control (CON) group.

These results show that NGF supplemented fetal tissue implanted in the NMDA-lesioned IC is able to recover the ability to learn a new CTA at 22 days post implantation, shown by the low intake of saline taste during the test of the CTA acquisition established after implantation (Fig. 5B), whereas the unsupplemented tissue did not show any recovery at this time, nor did the NGF alone, shown by the increased consumption in saline taste with comparison with the control. The group implanted with vehicle did not show a spontaneous recovery nor did the NGF-alone group as shown by the statistical differences with the control and with the NGF supplemented implants (Fig 5B). As in Experiment 1, the ability to remember CTA's established before lesioning did not show dependency on tissue specificity or pre treatment, since both groups implanted, supplemented with NGF or not, recovered this ability (Fig. 5A), whereas the groups that received Gelfoam with or without NGF did not recover the ability to recall either.

The results for the inhibitory avoidance task are similar to the results of the aquisition of the CTA, in that only tissue supplemented with NGF was able to recover the ability to learn. The acceleration of recovery of this task by trophic supplements, is in concordance with previous results

studying this effect (Escobar et al., 1994) which makes this task a positive control of the beneficial effects of the implants.

Discussion.

The results of these experiments showed that fetal brain grafts are able to induce recovery of the recall of CTA's acquired before an IC lesion. The IC NMDA lesion itself did not show spontaneous recovery at any of the times tested up to 52 days for either the retention (lesion made after training) or the acquisition (lesion made before training) of CTA's, so the recovery must be attributable to an action or an interaction of the graft on the host brain. In Experiment 1, it was shown that the tissue specificity seen here and elsewhere (Escobar et al., 1989) for the recovery of the ability to learn a new CTA, is not needed for the recovery of remembrance of CTA learned before lesions, where both homotopic and heterotopic grafted tissue was able to recover recall but only homotopic induced recovery of acquisition of new CTA's. Similarly, in Experiment 2 the data showed a dissociation between the recovery of recall and the recovery of learning, in that solely the implants supplemented with NGF induced recovery of both, whereas the implants without this factor and tested at 15 days post implantation, only showed remembrance of the CTA established before lesioning, and

were unable to acquire a new CTA conditioned after implantation.

Since lesions of the IC made several days after training a CTA still present disruption of this task, and this disruption can not be attributed to taste perception since taste reactivity is intact (Braun et al., 1982), one possible explanation is that it is the site for retention of the long term memory trace, which would account for the results obtained through biochemical analyses by Dudai and coworkers (Rosenblum, Meiri & Dudai, 1993; Rosenblum et al., 1995) where they find that memory retention for taste is dependant on protein synthesis and phosphorylation in the IC. Nevertheless, the implication of our results on the view of the participation of the IC in the conditioned taste aversion is that it can not be the neuroanatomical substrate for memory retention. Since IC destruction (lesion) produces deficiencies that can be reversed with fetal brain tissue implants, which implies that this substrate must lie in other regions, if any can be defined. In this way, the technique of fetal brain implants can be used as a "reversible lesion" model. Conversely to the chemically induced reversible lesions, the use of lesions-brain grafts assures the destruction of cells by the neurotoxin and therefore guarantees disruption of the memory trace, if any, in the structure involved; which is of paramount importance

in the study of long term memory traces. However, these results do suggest an important participation of the IC in the process of remembrance of acquired taste aversions, in that the IC must be intact, or be treated with fetal tissue implants after lesioning, for recall to happen. This complements the knowledge that the IC is strongly involved in the acquisition (ability to learn) a CTA, suggesting that the IC is a site mediating the input, consolidation, and retrieval of the associative information relevant to form a learned taste aversion. The mechanisms underlying acquisition and retrieval of the CTA, however, seem to be different since a strong tissue specificity is required for the recovery of the ability to learn, as noted by the fact that only homotopic tissue at 52 days post implant, or tissue supplemented with NGF at 22 days, showed recovery of learning, but the ability to retrieve was recovered in all fetal tissue implants.

Furthermore, the present data imply that the disruptive effect of IC lesions on CTA, cannot be attributed to an abnormal or a lack of perception of taste, since all implanted groups in both experiments were able to recognize, and therefore correctly perceive, the saccharin taste, even though they had received IC lesions. Even the possibility that the implants were restoring the supposed disrupted perception, this alone could not account for the differential

effects observed between learning and memory graft-induced recovery.

The recovery of the inhibitory avoidance task, in this case replicates results obtained elsewhere (Escobar et al., 1994) with electrolytic lesions, and in this case serves as a positive control of the different implants. Since the implants that recovered learning functions in the CTA were also able to recover the inhibitory avoidance task, it is reasonable to suspect that the mechanisms of action of the implants that allow the recovery of learning of CTA is the same for the recovery of the inhibitory avoidance task, and also that this recovery is accelerated by NGF supplements. Although it is known that lesions made several days after the inhibitory avoidance training have a disruptive effect (Piña, Ormsby & Bermúdez-Rattoni, 1991), the effect of the implants on the retrieval of this task has not been addressed yet.

The mechanisms of action of the implants on the host brain are difficult to assess with the present methodology; however, we can discard implant volume since no significant differences were observed between homotopic and heterotopic implants, and between NGF-supplemented and non supplemented implants, either in the Nissl or Acetyl cholinesterase stainings. The differential effect of the heterotopic and non-NGF-supplemented implants on

acquisition and retrieval, should be attributed to tissue maturity and differentiation, these factors being indispensable for learning (acquiring), but not for remembrance (recall). In the case of the implant induced recovery of recall, the most probable mechanism of action is through humoral diffusible factors (Björklund et al., 1987), since restored connectivity seems unlikely at 15 days post implant (Fernández-Ruiz et al., 1991) without addition of trophic factors. A series of experiments in our laboratory have correlated the recovery of CTA and inhibitory avoidance learning abilities with recovery of cholinergic function in the implants (Bermúdez-Rattoni, Ormsby, Escobar & Hernández-Echeagaray, 1995; Escobar, Jiménez, López-García, Tapia & Bermúdez-Rattoni, 1993; López-García et al., 1990), and it is reasonable to suppose these same mechanisms in these experiments, suggesting that memory retrieval of the CTA's is relatively independent of cholinergic function, since heterotopic and non-NGF-supplemented grafts, which have shown low cholinergic activity, induce recovery of this aspect of memory. A recent finding showed that the extracellular acetylcholine levels in the insular cortex rises to the presentation of a taste, but that this increase is significantly larger if the taste had been previously conditioned in a CTA procedure, as measured by *in vivo* microdialysis (Shimura, Suzuki & Yamamoto, 1995). In this regard we speculate that the rise in acetylcholine is

either non essential, or that it would be involved in further learnings, such as overtraining or extinction.

Further research is to be oriented towards finding the cellular and extracellular mechanisms that could be the substrate to graft induced recovery of recall, and the generalization of these findings to other behaviors.

REFERENCES.

- Benjamin, R. M., & 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., & Hiriart, M. (1992). Effects of NGF on the recovery of conditioned taste aversion in the insular cortex lesioned rats. In R. L. Doty (Ed.), *Chemical signals in vertebrate VI*, (pp. 297-303): Plenum Press.
- Bermúdez-Rattoni, F., Fernández, J., Sánchez, M. A., Aguilar-Roblero, R., & 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., & 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-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioning taste aversion. *Brain Research*, 49, 165-170.
- Bermúdez-Rattoni, F., Ormsby, C. E., Escobar, M. L., & Hernández-Echeagaray, E. (1995). The role of the insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behaviors. In J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, & R. A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory*, (Vol. 5, pp. 67-82). Hillsdale, N.J.: Lawrence Erlbaum Associates.
- Björklund, A., Lindvall, O., Isacson, O., Brundin, P., Victorin, K., Strecker, R. E., Clarke, D. J., & Dunnet, S.

- B. (1987). Mechanisms of action of intracerebral neural implants. Studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum. *Trends in Neuroscience*, 12, 509-516.
- Braun, J. J., Lasiter, P. S., & Kiefer, S. W. (1982). The gustatory neocortex of the rat. *Physiological Psychology*, 10, 13-45.
- Coyle, J. T., Price, D. L., & DeLong, M. T. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219, 1184-1190.
- Diaz-Cintra, S., Rivas, P., Escobar, M. L., Pérez-Torrero, L., Cintra, L., & Bermúdez-Rattoni, F. (1995). Morphometric study of fetal brain grafts in the insular cortex and NGF effects on neuronal and glial development. *Cell Transplantation*, 4, 505-513.
- Dugas-du-Villard, X., Her, C., & MacLeod, P. (1981). Qualitative discrimination of sweet stimuli: behavioral study on rats. *Chemical Senses*, 6, 143-148.
- Dunnett, S. B. (1994). Strategies for testing learning and memory abilities in transplanted rats. In S. B. Dunnett & A. Björklund (Eds.), *Functional neural transplantation*, (pp. 217-251). New York: Raven Press.
- Escobar, M., Fernández, J., Guevara-Aguilar, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (1989). Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion. *Brain Research*, 478, 368-374.
- Escobar, M. L., Jiménez, N., López-García, J. C., Tapia, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (1993). Nerve growth factor with insular cortical grafts induces recovery of learning and reestablishes graft choline acetyltransferase activity. *Journal of Neural Transplantation and Plasticity*, 4, 167-172.
- Escobar, M. L., Russell, R. W., Booth, R. A., & Bermúdez-Rattoni, F. (1994). Accelerating behavioral recovery after cortical lesions: I. Homotopic implants plus NGF. *Behavioral and Neural Biology*, 61, 73-80.

- Fernández-Ruiz, J., Escobar, M. L., Piña, A. L., Diaz-Cintra, S., Cintra-McGlone, F. L., & 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.
- García, J., Lasiter, P. S., Bermúdez-Rattoni, F., & Deems, D. A. (1985). General theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Science*, 443, 8-20.
- Hefti, F. (1986). Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *Journal of Neuroscience*, 6, 2155-2162.
- Kesner, R. P. (1991). Neurobiological views of memory. In J. L. Martinez & R. P. Kesner (Eds.), *Learning and memory: a biological view*, (pp. 499-547). San Diego, CA: Academic Press.
- Kiefer, S. W. (1985). Neural Mediation of Conditioning Food Aversions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 443, 100-109.
- López-García, J. C., Fernández-Ruiz, J., Bermúdez-Rattoni, F., & Tapia, R. (1990). Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts. *Brain Research*, 523, 105-110.
- McGaugh, J. L., Introini-Collison, I. B., & Nagahara, A. H. (1988). Memory enhancement with intra-amygdala posttraining naloxone is blocked by concurrent administration of propranolol. *Brain Research*, 466, 37-49.
- Norgren, R. (1984). Central neural mechanisms of taste. In I. Darian-Smith (Ed.), *Handbook of Physiology, The Nervous System, Sensory Processes III*, (pp. 1087-1128). Bethesda, MD: American Physiological Society.
- Patton, H. D. (1950). Physiology of taste and smell. *Annual Review of Physiology*, 12, 267-296.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press.

- Piña, A. L., Ormsby, C. E., & 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.
- Rosenblum, K., Meiri, M., & Dudai, Y. (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory neocortex. *Behavioral and Neural Biology*, 59, 49-56.
- Rosenblum, K., Schul, R., Meiri, N., Hadari, Y. R., Zick, Y., & Dudai, Y. (1995). Modulation of protein phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1157-1161.
- Russell, R. W., Escobar, M. L., Booth, R. A., & Bermúdez-Rattoni, F. (1994). Accelerating behavioral recovery after cortical lesions: II. in vivo evidence for cholinergic involvement. *Behavioral and Neural Biology*, 61, 81-92.
- Shimura, T., Suzuki, M., & Yamamoto, T. (1995). Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study. *Brain Research*, 679, 221-226.
- Varon, S., Hagg, T., Vahlsing, L., & Manthorpe, M. (1988). Nerve growth factor in vivo actions on cholinergic neurons in the adult rat CNS. In L. E. Todd, L. Packer, & J. Jaz (Eds.), *Cell Function and Disease*, (pp. 235-248). New York: Plenum Press.
- Verfaellie, M., & Cermak, L. S. (1991). Neuropsychological issues in amnesia. In J. L. Martinez & R. P. Kesner (Eds.), *Learning and memory: a biological view*, (pp. 467-492). San Diego, CA: Academic Press.
- Williams, L. R., Varon, S., Peterson, K., Wictorin, K., Fisher, W., Björklund, A., & Gage, F. H. (1986). Continuous infusion of nerve growth factor prevents basal forebrain neuronal death after fimbria-fornix transection.

Proceedings of the National Academy of Science USA,
83, 9231-9235.

Yamamoto, T. (1993). Neuronal mechanisms of taste
aversion learning. *Neuroscience Research*, 16, 181-185.

DISCUSIÓN.

Los resultados del Experimento 1 muestran que los animales que recibieron implantes homotópicos (corteza insular fetal) en la corteza insular adulta lesionada con N-metil-D-Aspartato son capaces de aprender un CAS presentado por primera vez, cuando éste es inducido a más de 45 días post-implante, mostrado por el bajo consumo de salina (fig. 2a, Exp. 1 de la sección de Procedimientos Experimentales y Resultados) y no así los animales implantados con tejido heterotópico (corteza occipital fetal), lo que replica resultados obtenidos previamente utilizando lesiones electrolíticas (Escobar et al., 1989; Fernández-Ruiz et al., 1991). Sin embargo, y de manera inesperada, la habilidad de recordar CAS establecidos antes de la lesión fue restaurado en ambos grupos lesionados, independientemente del origen (homo o heterotópico) del tejido fetal. Los animales que se mantuvieron lesionados no recuperaron espontáneamente ni la capacidad de recuerdo (fig. 2a, Exp. 1), ni la de aprendizaje de un CAS novedoso (fig. 2b, Exp. 1). Es de notarse la disociación que el grupo OccCx mostró en los efectos sobre la memoria (recuerdo) y el aprendizaje del condicionamiento aversivo al sabor. Los resultados de la

prevención pasiva (fig. 3, Exp.1) coinciden con los del aprendizaje (fig. 2b, Exp. 1) en que solo el grupo control y el ICx con implantes homotópicos mostraron aprendizaje de la tarea, coincidiendo también con resultados previos (Bermúdez-Rattoni et al., 1992).

En el Experimento 2, 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 tener un recuerdo de la adquisición (fig. 5a, Exp. 2). En el caso de los controles fué el resultado 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 (Garcia, 1990). En el caso de los grupos con injertos fetales (IC+NGF, IC-Veh) el hecho de que la respuesta se haya presentado, es un indicio de que estos 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 (GFM-NGF, GFM-Veh), los cuales al no poder recuperar la función, presentaron resultados que corresponderían a animales con lesión de la corteza insular (fig. 5a, Exp. 2). En el caso de la evocación del CAS, es de notarse que la aplicación del factor

de crecimiento neuronal (NGF) no parece ejercer ningún efecto, ya que tanto los animales que recibieron transplantes de corteza insular (CI) fetal con NGF como los que lo recibieron solo con el vehículo recuperaron la capacidad para evocar; mientras que los grupos Glfm-NGF y Glfm-Veh no pudieron recuperar y sus resultados son muy similares, a pesar de que el grupo Glfm-NGF recibió el factor, lo que sugiere que la recuperación de la evocación es un proceso independiente del NGF. No así la recuperación de la capacidad para adquirir un nuevo CAS. Como era esperado, los animales que recibieron transplantes con el NGF (IC+NGF) fueron capaces de obtener en dos ensayos valores de aversión similares al control cuando fueron reentrenados para adquirir una nueva aversión condicionada (fig. 5b, Exp. 2), 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. 5b, Exp. 2) replican de alguna manera los resultados obtenidos por Escobar y cols. (1993) 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 NGF. 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 que, como se indicó en el procedimiento, en 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 NGF (aplicación= recupera, solo vehículo= no recupera) sí pudo hacerse patente dado que el grupo IC+NGF 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 NGF. 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 IC+NGF 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 este 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 de alguna manera interferir con la adquisición del nuevo condicionamiento aversivo a la salina. La segunda diferencia, y probablemente la más importante, es que en este experimento se utilizó por primera vez en la literatura, hasta donde conocemos, un trasplante fetal en una lesión inducida por la neurotoxina N-Metil-D-Aspartato (NMDA); en los modelos anteriores de corteza insular sólo 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 ésta (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 por NMDA.

La similitud anatómica gruesa que mostraron los injertos fetales con o sin el NGF, 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 NGF 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 en otros estudios (López-García, Fernández-Ruiz, Bermúdez-Rattoni & Tapia, 1990).

Los resultados mostrados en ambos experimentos indican que las lesiones post-consolidación producen un impedimento en la evocación de las respuestas de condicionamiento aversivo a los sabores (fig. 2a, Exp. 1 y fig. 5a, Exp. 2), al compararse el grupo lesionado (Lx) o con gelfoam con el control intacto (CON). 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 estas tareas.

De esta manera se complementa la serie de resultados obtenidos en donde se demuestra la participación de la CI en la adquisición (Benjamin & Pfaffman, 1955; Braun et al., 1982) y consolidación (Bermúdez-Rattoni & McGaugh, 1991) del condicionamiento aversivo a los sabores, así como de la prevención pasiva (Bermúdez-Rattoni et al., 1991). Estas deficiencias 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 Lasiter y Glanzman (1985) 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), y 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 esta conducta (Braun et al., 1982; para una revisión). Recientemente se ha mostrado la participación de la CI en la consolidación del CAS y los resultados aquí mostrados indican que la CI está involucrada además en la memoria a largo plazo de esta 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 de la formación de la memoria (adquisición, consolidación, retención y evocación) dado que las lesiones durante cualquiera de estas 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 y cols. (1991) se encontró que la inactivación por tetrodotoxina de la corteza insular antes e inmediatamente después del condicionamiento de prevención pasiva produce deficiencias en la prueba 24 hrs más tarde. Estas deficiencias pueden ser atribuídas 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 1 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 continuo 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 transplantes 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 IC-Veh) o con implantes de tejido tomado de la corteza occipital fetal, 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 trasplantes, no debería haberse observado la disociación, dado que los animales de los grupos IC-Veh y OccCx tenían trasplantes capaces de recuperar la evocación (fig. 2a, Exp. 1 y 5a, Exp. 2), pero aún así no pudieron adquirir una nueva respuesta aversiva al sabor (fig. 2b, Exp. 1 y fig. 5b, Exp. 2). Adicionalmente, el hecho de que los animales con trasplantes de CI con el factor de crecimiento neuronal (grupo IC+NGF) fueran capaces de recuperar la evocación de una respuesta previamente aprendida (fig. 5a, Exp. 2) y además la adquisición de una nueva (fig. 5b, Exp. 2), a diferencia del grupo CI-Veh que no recibió el NGF, indica que la recuperación de la capacidad para evocar es un proceso

independiente del factor trófico, mientras que la recuperación de de la adquisición (por lo menos a los 20 días post-implante) es un proceso dependiente de NGF exógeno. Esto apoya aún más la noción de la disociación del papel de la CI en la adquisición y en la evocación.

Retomando el tema que se planteó en los antecedentes acerca del problema para definir los componentes del CAS, dado que en los presentes experimentos las primeras manipulaciones se realizaron después de la consolidación del CAS, no es posible utilizar estos datos para concluir acerca de los procesos neurales que subyacen las fases de adquisición y consolidación, que son los abordados por Garcia (1990) y Chambers (1990). Sin embargo el mecanismo de recuerdo sí puede ser discutido. En el caso de la explicación pavloviana de Chambers, la CI sería una estructura necesaria para que se dé la asociación entre el estímulo condicionado (sabor) que se presenta y el recuerdo del incondicionado (malestar). En el caso de los animales con lesión de CI esta asociación no se presenta, por lo que se evoca la respuesta incondicionada (ingesta) en lugar de la condicionada (evitación). Los implantes restauran la capacidad de hacer la asociación. El caso de la interpretación de Garcia presenta una dificultad. Dado que en este caso el EI (sabor) cambió de valor hedónico por la acción de la retroalimentación (malestar), esto sugiere a

primera vista que el regreso al valor hedónico anterior sólo se daría por un procedimiento de condicionamiento en el cual el sabor se asocia con una retroalimentación hedónicamente positiva, o por una alteración en la estructura del organismo (en este caso lesión) que cancele los efectos del condicionamiento, y a su vez estas alteraciones pueden ser revertidas (por implantes). Esto implica que el cambio hedónico del EI no es permanente, y que debe ser mantenido por alguna función neural específica. En ambos casos parece claro que el mecanismo de recuerdo implica una nueva asociación del estímulo sávido que se presenta con la memoria del estado del organismo durante el malestar gástrico (llámese retroalimentación o EI), y que esta asociación depende de la integridad de la corteza insular. También es claro en ambos casos que los cambios sinápticos que contienen la información del condicionamiento se encuentran en otro u otros lados del sistema nervioso, o tienen una organización tal, que la destrucción de una parte de ella (la CI), no destruye el trazo de memoria de una manera tal que sea irrecuperable.

Los mecanismos de acción de los implantes sobre el cerebro hospedero son muy difíciles de observar con la presente metodología; sin embargo se puede descartar el volúmen del implante dado que no se encontraron

diferencias significativas entre implantes homotópicos y heterotópicos, ni entre implantes fetales suplementados o no con NGF, ni en la tinción de Nissl ni con la histoquímica de colinesterasa. El efecto diferencial de los implantes heterotópicos y los no suplementados sobre la adquisición y el recuerdo, debe ser atribuido a la madurez del tejido y diferenciación, siendo estos factores indispensables para el aprendizaje (adquisición), pero no para el recuerdo (evocación). En el caso de la recuperación del recuerdo inducido por implantes cerebrales, el mecanismo de acción más probable es a través de factores humorales difusibles (Björklund et al., 1987), dado que un reestablecimiento de conexiones parece ser improbable a los 15 días post implante (Fernández-Ruiz et al., 1991) sin factores tróficos adicionales. Una serie de experimentos han demostrado una correlación entre la recuperación de habilidades de aprendizaje de CAS y prevención pasiva con una recuperación de funciones colinérgicas en los implantes (Bermúdez-Rattoni, Ormsby, Escobar & Hernández-Echeagaray, 1995; Escobar et al., 1993; López-García et al., 1990) y es razonable suponer estos mismos mecanismos en los experimentos aquí presentados, sugiriendo que la recuperación del recuerdo de aversiones al sabor es relativamente independiente de la función colinérgica, dado que en los estudios citados se mostró que los implantes heterotópicos y los homotópicos no

suplementados a los 15 días mostraron una función colinérgica alterada, pero aún así indujeron recuperación del recuerdo.

La importancia que estos datos tienen sobre el estudio del aprendizaje y la memoria, radica principalmente en que se demuestra que el proceso de recuerdo de las respuestas condicionadas es uno que es activo y con sustratos neurales distintos, como plantea Rescorla (1988). También aporta información al estudio de las amnesias retrógradas persistentes, que aunque infrecuentes en la literatura clínica, aportan un gran contenido de investigación básica de la memoria (Squire et al., 1993). Se puede continuar de esta manera con estudios sobre las bases neurales del recuerdo, que ha sido hasta ahora un área muy poco estudiada, comparativamente con el número de estudios sobre aprendizaje y consolidación. Sin embargo deja abierto el problema de la localización del trazo de memoria, pues sólo se puede afirmar que no está en la CI, pero los datos no indican a ningún otro candidato.

Dentro de los aspectos de este trabajo que sería importante seguir estudiando estarían la posibilidad de que existan 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 que 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.

Otra área de interés es el estudio de los efectos de los diversos implantes sobre otras conductas aparte del CAS, como lo son la prevención pasiva y el laberinto de agua. Estos datos podrían servir para comprender mejor los procesos en que está involucrada la corteza insular.

REFERENCIAS.

- Agranoff, B. W., Davis, R. E., Casola, L., & Lim, R. (1967). Actinomycin blocks formation of memory of shock avoidance. *Science*, 158, 1600-1601.
- Benjamin, R. M., & 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., & Hiriart, M. (1992). Effects of NGF on the recovery of conditioned taste aversion in the insular cortex lesioned rats. In R. L. Doty (Ed.), *Chemical signals in vertebrate VI*, (pp. 297-303): Plenum Press.
- Bermúdez-Rattoni, F., Fernández, J., & Escobar, M. L. (1989). Fetal brain transplants induce recovery of morphological and learning deficits of cortical lesioned rats. In L. E. Canedo, T. L.E., L.E.Packer, & J. Jaz (Eds.), *Cell Function and Disease*, (pp. 261-273). New York: Plenum Press.
- Bermúdez-Rattoni, F., Fernández, J., Sánchez, M. A., Aguilar-Roblero, R., & 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., & 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-Rattoni, F., & McGaugh, J. L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioning taste aversion. *Brain Research*, 49, 165-170.

- Bermúdez-Rattoni, F., Ormsby, C. E., Escobar, M. L., & Hernández-Echeagaray, E. (1995). The role of the insular cortex in the acquisition and long lasting memory for aversively motivated behaviors. In J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, & R. A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory*, (Vol. 5, pp. 67-82). Hillsdale, N.J.: Lawrence Erlbaum Associates.
- Björklund, A. (1991). Neural transplantation: an experimental tool with clinical possibilities. *Trends in Neuroscience*, *14*, 319-322.
- Björklund, A., & Dunnett, S. B. (1995). Acetylcholine revisited. *Nature*, *375*, 446.
- Björklund, A., Lindvall, O., Isacson, O., Brundin, P., Wictorin, K., Strecker, R. E., Clarke, D. J., & Dunnet, S. B. (1987). Mechanisms of action of intracerebral neural implants. Studies on nigral and striatal grafts to the lesioned striatum. *Trends in Neuroscience*, *12*, 509-516.
- Björklund, A., & Steveni, U. (1985a). Intracerebral neural grafting: a historical perspective. In A. Björklund & U. Steveni (Eds.), *Neural Grafting in the Mammalian Central Nervous System*, (Vol. 5, pp. 3-14). Amsterdam: Elsevier.
- Björklund, A., & Steveni, U. (1985b). *Neural Grafting in the Mammalian Central Nervous System*. (Vol. 5). Amsterdam: Elsevier.
- Borison, H. L., & Wang, S. C. (1953). Physiology and pharmacology of vomiting. *Pharmacological Review*, *5*, 193-230.
- Braun, J. J., Lasiter, P. S., & Kiefer, S. W. (1982). The gustatory neocortex of the rat. *Physiological Psychology*, *10*, 13-45.
- Brundin, P., Nilsson, O. G., Gage, F. H., & Björklund, A. (1985). Cyclosporin A increases survival of cross-species intrastriatal grafts of embryonic dopamine-containing neurons. *Experimental Brain Research*, *60*, 204-208.

- Coil, J. D., & 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., & Kesslak, P. (1988). The role of trophic factors in behavioral recovery and integration of transplants. In D. M. Gash & J. R. Sladek (Eds.), *Progress in Brain Research*, (Vol. 78,). Amsterdam: Elsevier.
- Coyle, J. T., Price, D. L., & DeLong, M. T. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219, 1184-1190.
- Chambers, K. C. (1990). A neural model for conditioned taste aversions. *Annual Review of Neuroscience*, 13, 373-385.
- Drachman, D. A., & Sahakian, B. J. (1980). Memory, ageing and pharmacosystems. In D. Stein (Ed.), *The psychobiology of ageing: problems and perspectives*, (pp. 357-363). Amsterdam: Elsevier.
- Duncan, C. P. (1949). The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 42, 32-44.
- Dunnett, S. B., & Bjorklund, A. (1987). Mechanisms of function of neural grafts in the adult mammalian brain. *Journal of Experimental Biology*, 132, 256-289.
- Escobar, M., Fernández, J., Guevara-Aguilar, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (1989). Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion. *Brain Research*, 478, 368-374.
- Escobar, M. L., Jiménez, N., López-García, J. C., Tapia, R., & Bermúdez-Rattoni, F. (1993). Nerve growth factor with insular cortical grafts induces recovery of learning and reestablishes graft choline acetyltransferase activity. *Journal of Neural Transplantation and Plasticity*, 4, 167-172.

- Fernández-Ruiz, J., Escobar, M. L., Piña, A. L., Diaz-Cintra, S., Cintra-McGlone, F. L., & 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., & 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., & 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., & Rodgers, C. R. (1988). Intraventricular brain allografts and xenografts: Studies of survival and rejection with and without systemic sensitization. In D. M. Gash & J. R. Sladek (Eds.), *Progress in Brain Research*, (Vol. 18, pp. 233-241). Amsterdam: Elsevier.
- Freed, W. J., Medinaceli, L., & Wyatt, R. J. (1985). Promoting functional plasticity in the damaged nervous system. *Science*, 227, 1544-1552.
- Garcia, J. (1990). Learning without memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 2, 287-305.
- Garcia, J., Kimeldorf, D. J., & Koelling, R. A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122, 157-158.
- Garcia, J., & Koelling, R. A. (1966). Relation of the cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*, 5, 123-124.
- Garcia, J., Lasiter, P. S., Bermúdez-Rattoni, F., & Deems, D. A. (1985). General theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Science*, 443, 8-20.

- Garcia, J., McGowan, B. K., & Green, K. (1972). Biological constraints on conditioning. In M. E. P. Seligman & J. L. Hager (Eds.), *Biological Boundaries of Learning*, . New York: Meredith.
- Grill, H. J., & Norgren, R. (1978). The taste reactivity test: mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Research*, 143, 263-279.
- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. New York: Wiley.
- Hefti, F. (1986). Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *Journal of Neuroscience*, 6, 2155-2162.
- Jeager, C. B., & Lund, R. D. (1980). Transplantation of embryonic occipital cortex to the tectal region of newborn rats: A light microscopic study of organization and connectivity of the 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., Schacher, S., Castelluci, V. F., & Goelet, P. (1987). The long and short of memory in *Aplysia*: a molecular perspective, *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures*, . Padova: Liviana Press.
- Kiefer, S. W. (1985). Neural Mediation of Conditioning Food Aversions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 443, 100-109.
- Krushel, L. A., & Kooy, D. V. d. (1988). Visceral Cortex: Integration of the mucosal senses with limbic information in the rat agranular insular cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 270, 39-54.
- Kupferman, I., & Kandel, E. R. (1969). Neuronal controls of a behavioral response mediated by the abdominal ganglion of "*Aplysia*". *Science*, 164, 847-850.

- Lashley, K. S. (1950). In search of the engram. In T. C. o. B. Ltd. (Ed.), *Society of Experimental Biology Symposium No. 4: Physiological Mechanisms in Animal Behavior*, (pp. 287-313). Cambridge: Cambridge University Press.
- Lasiter, P. S., & Glanzman, D. L. (1985). Cortical substrates of taste aversion learning: Involvement of the dorsolateral amygdaloid nuclei and the temporal neocortex in taste aversion learning. *Behavioral Neuroscience*, 99, 257-276.
- Lavond, D., Kim, J. J., & Thompson, R. F. (1993). Mammalian brain substrates of aversive conditioning. *Annual Review of Psychology*, 44, 317-314.
- Leonard, J. L., Edstrom, J., & Lukowiak, K. (1989). Reexamination of the gill withdrawal reflex of *Aplysia Californica* Cooper (Gastropoda; Opisthobranchia). *Behavioral Neuroscience*, 103, 585-604.
- López-García, J. C., Bermúdez-Rattoni, F., & Tapia, R. (1990). Release of acetylcholine, γ -aminobutyrate, dopamine and glutamate, and activity of some related enzymes, in rat gustatory neocortex. *Brain Research*, 523, 100-104.
- López-García, J. C., Fernández-Ruiz, J., Bermúdez-Rattoni, F., & Tapia, R. (1990). Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts. *Brain Research*, 523, 105-110.
- Lubek, I., & Apfelbaum, E. (1987). Neo-behaviorism and the Garcia effect: A social psychology of science approach to the history of a paradigm clash. In M. G. Ash & W. R. Woodward (Eds.), *Psychology in Twentieth-Century Thought and Society*, (pp. 59-91). Cambridge: Cambridge University Press.
- McGaugh, J. L. (1966). Time dependant process in memory storage. *Science*, 153, 1351-1358.

- McGaugh, J. L., Introini-Collinson, I. B., Nagahara, A. H., Cahill, L., Brioni, J. D., & Castellano, C. (1990). Involvement of the amygdaloid complex in neuromodulatory influences on memory storage. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, *14*, 425-431.
- McGaugh, J. L., Introini-Collinson, I. B., & Nagahara, A. H. (1988). Memory enhancement with intra-amygdala posttraining naloxone is blocked by concurrent administration of propranolol. *Brain Research*, *466*, 37-49.
- McNaughton, B. L., & Morris, R. G. M. (1987). Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends in Neuroscience*, *10*, 408-415.
- Nieto-Sampedro, M., & Cotman, C. W. (1986). Growth factor induction and temporal order in CNS repair. In C. W. Cotman (Ed.), *Synaptic Plasticity and Remodeling*, (pp. 407-456). New York: Guilford Press.
- Norgren, R. (1974). Gustatory afferents to ventral forebrain. *Brain Research*, *81*, 285-295.
- Norgren, R., & Wolf, G. (1975). Projections of thalamic gustatory and lingual areas in the rat. *Brain Research*, *92*, 123-129.
- Ormsby, C. E., Piña, A. L., Ramírez-Amaya, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1993). Differential effects of insular cortex lesions in a place conditioning task. *Society for Neuroscience Abstracts*, *19*, 1229.
- Pascoe, J. P., & Kapp, B. S. (1987). Responses of amygdaloid central nucleus neurons to stimulation of the insular cortex in awake rabbits. *Neuroscience*, *21*, 471-485.
- Patton, H. D. (1950). Physiology of taste and smell. *Annual Review of Physiology*, *12*, 267-296.
- Pavlov, I. P. (1927, 1994). *Reflejos condicionados e inhibiciones*. (Vol. 17). Barcelona: Planeta.

- Perry, E. K., Tomlinson, B. E., Blessed, G., Bergmann, K., Gibson, P. H., & Perry, R. H. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *British Medical Journal*, 2, 1457-1459.
- Rescorla, R. A. (1988). Pavlovian conditioning: It's not what you think it is. *American Psychologist*, 43, 151-60.
- Rescorla, R. A., & Holland, P. C. (1982). Behavioral studies of associative learning in animals. *Annual Review of Psychology*, 33, 265-308.
- Rosenzweig, M. R. (1996). Aspects of the search for the neural mechanisms of memory. *Annual Review of Neuroscience*, 47, 1-32.
- Rozin, P. (1967). Specific aversions as a component of specific hungers. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 64, 237-242.
- Seiger, A. (1985). *Neural grafting in the mammalian CNS*. B.V.: Elsevier Science Publishers.
- Shirai, Y. (1921, 1985). Transplantation of rat sarcoma in adult heterogeneous animals. In A. Björklund & U. Steveni (Eds.), *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., & Jagielo, J. A. (1990). Animal memory and learning. *Annual Review of Psychology*, 41, 169-211.
- Springer, J. E., & Loy, R. (1985). Intrahippocampal injection of antiserum to nerve growth factor inhibit sympathohippocampal sprouting. *Brain Research Bulletin*, 15, 639-634.
- Squire, L. R., Knowlton, B., & Musen, G. (1993). The structure and organization of memory. *Annual Review of Psychology*, 44, 453-495.

- Stenevi, U., Björklund, A., & 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.
- Thompson, R. F. (1986). The neurobiology of learning and memory. *Science*, 233, 941-947.
- Toniolo, G., Dunnett, S. B., Hefti, F., & Will, B. (1985). *Brain Research*, 345, 141-146.
- Varon, S., Hagg, T., Vahlsing, L., & Manthorpe, M. (1988). Nerve growth factor in vivo actions on cholinergic neurons in the adult rat CNS. In L. E. Todd, L. Packer, & J. Jaz (Eds.), *Cell Function and Disease*, (pp. 235-248). New York: Plenum Press.
- Yamamoto, T., Yayama, N., & Kawamura, Y. (1981). Cortical neurons responding to tactile, thermal, and taste stimulations of the rat's tongue. *Brain Research*, 221, 202-206.