

19  
1032

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGIA**



**FACTOR DEL CRECIMIENTO**  
**NERVIOSO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**CIRUJANO DENTISTA**  
**P R E S E N T A**

**MARIA DE LOURDES URBINA MANIT**

**México, D. F.**

**15387 1979**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
FACTOR DEL CRECIMIENTO NERVIOSO	2
El descubrimiento del Factor del Crecimiento Nervioso seguido de una investigación general de su influencia en las terminaciones periféricas y órganos asociados con los centros nerviosos	2
Estudios estructurales del Factor del Crecimiento Nervioso	5
Efectos morfológicos del Factor del Crecimiento Nervioso	10
Desarrollo de los nervios	11
Efecto del Factor del Crecimiento Nervioso - sobre estos procesos	15
Análisis del efecto del Factor del Crecimiento Nervioso sobre los ganglios nerviosos	18
Desarrollo del Sistema Nervioso Simpático	26
Efecto del Factor del Crecimiento Nervioso - en el Sistema Nervioso Simpático	29
Análisis del Factor del Crecimiento Nervioso en el Sistema Nervioso Simpático	32

Factor del Crecimiento Nervioso y Neuronas - Cortas Adrenérgicas	34
Factor del Crecimiento Nervioso y la Médula- Adrenal	35
Lesiones del Sistema Nervioso Simpático-Res- puesta de Lesiones en Neuronas al Factor del Crecimiento Nervioso	35
Factor del Crecimiento Nervioso antisuero inmunosimpatectomía	36
Simpactectomía Quirúrgica	38
Simpactectomía Química	40
Factor del Crecimiento Nervioso y Sistema Nervioso Central	41
Mecanismo de acción del Factor del Crecimien- to Nervioso	42
Receptores al Factor del Crecimiento Nervio- so	43
Transporte en el axón retrógrado del Factor- del Crecimiento Nervioso	49
Fuentes del Factor del Crecimiento Nervioso	51
Efectos metabólicos del Factor del Creci- miento Nervioso	54
Resumen	58

FACTOR DEL CRECIMIENTO NERVIOSO Y ENFERMEDADES- DEL SISTEMA NERVIOSO	61
Neuroblastoma	62
Factor del Crecimiento Nervioso y Neuroblas- toma	66
Administración del Factor del Crecimiento -- Nervioso pacientes con Neuroblastoma	69
Estudios de neuroblastoma en tejidos de cul- tivo	70
FACTOR DEL CRECIMIENTO NERVIOSO. DISCUSION	73
Feocromocitoma	74
Neurofibromatosis (Enfermedad de Von Recklin- ghausen)	75
Neuropatías sensoriales hereditarias	78
Enfermedad de Hipotensión Idiopática (Sindro- me de Shy-Drager)	84
DISCUSION	85
BIBLIOGRAFIA	90

## INTRODUCCION

La Odontología como ciencia sigue un curso de desarrollo ascendente al paralelo de otras ciencias y se nutre de ellas. Si se redujera a mera tecnología no sería una verdadera ciencia. Por ello, temas como el Factor del Crecimiento Nervioso, interesan al odontólogo. Esta es una sustancia aún no clasificada en grupos hormonales que se fabrica en las glándulas salivales del mamífero y que hace crecer a las neuronas. Ciertos tumores malignos de origen neuronal - crecen anormalmente bajo el influjo del Factor de Crecimiento Nervioso y pudiesen tratarse con anticuerpos contra este.

De allí la importancia de estudiar esta sustancia que a la ciencia odontológica toca muy de cerca por fabricarse en las glándulas salivales.

Con esta pequeña contribución queremos ayudar a estar a la altura de la profesión e investigación mundial de vanguardia en las ciencias del Siglo XX.

## FACTOR DEL CRECIMIENTO NERVIOSO

El Factor del Crecimiento Nervioso es una proteína que es necesaria para el crecimiento y mantenimiento de las neuronas simpáticas y algunas otras neuronas sensoriales. Un número de estudios recientes han indicado que el Factor del Crecimiento Nervioso se presenta en varias enfermedades del Sistema Nervioso humano de manera alterada. Esta tesis revisa todos los estudios después de considerar la información-pertinente actual total de los efectos del Factor del Crecimiento Nervioso en las células blanco de los animales.

El descubrimiento del Factor del Crecimiento Nervioso se-  
guido de una investigación general de su influencia en las  
terminaciones periféricas y órganos asociados con los cen-  
tros nerviosos

Para tener una información relativamente homogénea el autor Bueker implantó sarcomas de ratas No. 180 en la pared del cuerpo de los embriones de pollo. Encontró que los ganglios de la región dorsal inervados por este tumor crecían de 20 a 40 %. En contraste no había estimulación de crecimiento en las motoneuronas. Las propiedades intrínsecas del

sarcoma fueron consideradas que eran las responsables de estos resultados. Levi-Montalcini y Hamburger ampliaron estas observaciones considerablemente y notaron que los ganglios simpáticos también crecían y participaban en la inervación nerviosa al tumor. La especificidad del efecto de crecimiento de las neuronas simpáticas y sensoriales fue atribuída a la producción de un factor específico por el sarcoma. Este factor se encontró que se difundía cuando los efectos eran sacados de fragmentos de sarcomas y colocados en membrana corialtóica y por lo tanto en contraste con el embrión huésped a través de la circulación. Desde ésta época se conoce a este factor con el nombre de Factor del Crecimiento Nervioso.

Muchas de las caracterizaciones tempranas de los efectos del Factor del Crecimiento Nervioso se llevaron a cabo con el sarcoma y extractos de sus células libres. Para purificar el Factor del Crecimiento Nervioso del tumor se encontró de manera fortuita que existían mil veces concentraciones más altas en el veneno de la serpiente. En el examen subsecuente de tejidos análogos de la serpiente venenosa y sus glándulas, se encontró que de todas las fuentes de la naturaleza la más rica de Factor del Crecimiento Nervioso es la glándula submaxilar del ratón macho adulto. Este úl-



El timo tejido ha sido por lo tanto el preferido para obtener y purificar el Factor del Crecimiento Nervioso y provee esta substancia en cantidades suficientes para poder ser estudiada.

Antes de discutir en qué enfermedades del hombre se ha examinado el Factor del Crecimiento Nervioso, revisaremos el progreso realizado en caracterizar esta substancia a nivel molecular. Adicionalmente, discutiremos los efectos morfológicos de su acción. En años recientes, un gran progreso ha sido realizado en el estudio de este factor y cómo interactúa con las células responsables para sus efectos característicos. Aunque aún son incompletos, estos estudios han -- identificado dos aspectos de la interacción. Por un lado -- existen receptores macromoleculares responsables de los tejidos en donde se une el Factor del Crecimiento Nervioso y por otro lado el Factor del Crecimiento Nervioso es llevado por los axones a la región terminal del órgano y transportado de manera retrógrada al cuerpo de la célula. La mayor -- parte de los estudios se han caracterizado por esos precisos procesos y serán discutidos, igualmente que los factores metabólicos que tienen que ver con la acción del Factor del Crecimiento Nervioso. Se han revisado una serie larga -- de publicaciones para ver los efectos del Factor del Creci-

miento Nervioso en los sistemas animales.

### Estudios estructurales del Factor del Crecimiento Nervioso

Trabajando con material parcialmente purificado de la glándula submaxilar del ratón macho adulto, Cohen demostró que existe esta actividad promotora del crecimiento de los nervios y su preparación es destruída incubando con enzimas proteolíticas. Más aún, anticuerpos obtenidos de este material inhiben su actividad biológica. Basándose en estos resultados, como también en la demostración de la actividad biológica y su sedimento con proteína, Cohen concluye que el Factor del Crecimiento Nervioso aislado de las glándulas submaxilar del ratón es una proteína. En las últimas dos décadas los detalles de la estructura del Factor del Crecimiento Nervioso han sido descubiertos, su secuencia de aminoácidos determinada, su proteína cristalizada y se ha realizado incluso su estructura tridimensional. De estos estudios sabemos con claridad ahora que esta substancia es un dímero compuesto de dos cadenas idénticas de 118 aminoácidos unidos por fuerzas no covalentes. Dos maneras diferentes de aislar han sido desarrolladas para obtener esta información. Las proteínas aisladas por estos procedimientos-

llamadas beta Factor del Crecimiento Nervioso y 2.5S Factor del Crecimiento Nervioso, difieren únicamente en la extensión en la cual las cadenas péptidas han sufrido en su enlace proteolítico.

Para establecer la base molecular de las observaciones de esta substancia en las células blanco, Frazier y colaboradores, hicieron una comparación detallada de los aminoácidos y su secuencia con otro número de factores tróficos cuyas funciones y mecanismos de acción eran mejor conocidos. De las proteínas estudiadas únicamente las insulinas y preinsulinas tenían una estructura parecida al Factor del Crecimiento Nervioso. Más aún, estos autores han extendido su comparación y las insulinas han demostrado similitudes en la tercera dimensión de las estructuras de las proteínas. A nivel de ambas estructuras secundarias, el Factor del Crecimiento Nervioso y la preinsulina, contienen una proporción relativamente baja de una estructura alfa helicoidal en un 10 a 14 % respectivamente. En la ausencia de cristalografía por rayos X los estudios químicos han probado que los residuos de tiroxina triptofano del Factor del Crecimiento Nervioso son usados como comparación para la conformación de la solución de esta substancia con una estructura cristalina conocida de insulina. En base a sus observaciones, Fra-

zier y colaboradores, concluyen que de alguna manera alguno de los residuos de la subsecuencia del Factor del Crecimiento Nervioso y la insulina tienen posiciones topográficas similares.

Aunque los datos ya mencionados indican que el Factor del Crecimiento Nervioso y las insulinas son parecidos, la conclusión final no ha sido todavía escrita. En trabajos recientes Argos, usando una estructura fina y métodos basados en la secuencia de aminoácidos, pudo predecir la estructura secundaria del Factor del Crecimiento Nervioso. El nota que la región de esta substancia que se predice que tiene una estructura alfa helicoidal no correlaciona con la estructura alfa helicoidal de la insulina y por lo tanto cuestiona los grados parecidos entre ambas substancias. Estudios llevados a cabo recientemente indican que la estructura tridimensional del Factor del Crecimiento Nervioso basada en la cristalografía de rayos X dará la resolución final a esta pregunta. Independientemente de esto, el propósito de que el Factor del Crecimiento Nervioso y las insulinas nos lleven hacia descubrimientos importantes en la dirección más reciente, se discutirá más adelante. Así mismo, estas substancias nos han llevado a aislar una proteína precursora -- del Factor del Crecimiento Nervioso y a demostrar la presen

cia de receptores específicos para esta substancia.

La actividad del Factor del Crecimiento Nervioso se extrae de las glándulas submaxilares del mamífero con un PH - neutral en especies cuyo peso molecular es muy alto. Estas especies llamadas 7S Factor del Crecimiento Nervioso, contienen una proteína llamada subunidad beta. Otros dos tipos de proteína, la subunidad alfa y la arginina y dos zonas para iones de zinc. El factor del crecimiento nervioso dímero es biológicamente activo por sí solo y no requiere que las subunidades alfa y gama realicen efectos asociados. Se ha propuesto un número de hipótesis para indicar la presencia de otras subunidades en la 7S; de acuerdo a una de ellas -- (la más atractiva) ha sido la del papel del complejo 7S en la biosíntesis, almacén y protección del Factor del Crecimiento Nervioso. En presencia de la 7S y de la estereopeptidasa-arginina y con una proteína con terminal carboxílico - se encuentran residuos de arginina igual que la secuencia - homóloga entre la proinsulina, lo cual indica que el Factor del Crecimiento Nervioso se deriva de precursores de cadenas largas por acción proteolítica de la estereopeptidasa. - de acuerdo a esta hipótesis el gene que produce la síntesis del Factor del Crecimiento Nervioso es un pro-gene de cadena polipéptida y está enrollado en la subunidad gama en el

puente peptídico al cual los residuos de arginina en la posición 118 contribuyen al grupo carbonílico para generar la cadena completa. En contraste con la producción completa típica de la enzima que rápidamente se disocia; la estereopeptidasa-arginina queda unida al Factor del Crecimiento Nervioso después de que se rompe la cadena principal. La subunidad alfa y los iones zinc se asocian con la pro-Factor del Crecimiento Nervioso y se unen al complejo de unidades gama después de que éstas se separan para dar un resultado final a la formación de la 7S Factor del Crecimiento Nervioso.

Aunque varias evidencias indirectas han sido halladas para indicar ésta hipótesis del precursor, los datos más convincentes han sido de estudios recientes de experimentos por Berger y Shooter. Estos trabajadores han identificado un precursor y demostrado que la incubación del precursor con subunidades gamma del factor 7S resulta en la conversión del precursor al Factor del Crecimiento Nervioso. La unión final de la subunidad gama queda pegada al producto de la cadena de la pro-Factor del Crecimiento Nervioso. Una ventaja potencial de este fenómeno es que la cadena a la cual se le une la 7S queda protegida del efecto posterior proteolítico.

Los datos existentes indican que el Factor del Crecimiento Nervioso en la forma de complejo 7S está protegido para que siga destruyéndose por su nitrógeno terminal endopeptidasa y una carbopeptidasa unida a una enzima en forma de V que se encuentran en las glándulas submaxilares.

De acuerdo con lo descrito nos damos cuenta que el Factor del Crecimiento Nervioso ha sido aislado del veneno de serpientes. Estudios a nivel molecular han indicado que las proteínas que salen de la glándula submaxilar y de los diferentes venenos de serpientes no son idénticas, pero estructuralmente se parecen de acuerdo al criterio immunoquímico. En un estudio más detallado de la comparación de estas proteínas Hogue-Angeletti demostraron que aproximadamente el 60 % de la cadena de aminoácidos de la sustancia de la glándula submaxilar es parecida a la sustancia del veneno de la cobra. En esta revisión que hacemos nosotros utilizaremos el nombre de Factor del Crecimiento Nervioso para referirnos a este grupo de sustancias protéicas parecidas de diversas fuentes obtenidas como ya se ha citado.

### Efectos morfológicos del Factor del Crecimiento Nervioso

Para conocer los efectos de esta sustancia en la vida y en

Las células blancas es necesario mencionar una serie de desarrollos normales del individuo. Los ganglios de la cadena dorsal y sus neuronas sensoriales y simpáticas van a ser -- enumeradas antes de describir el efecto de las sustancias -- sobre ella. Otras secciones de esta descripción tratarán sobre el efecto en la médula adrenal y ciertas neuronas que -- contienen catecolaminas en el sistema nervioso central.

### Desarrollo de los nervios

La información sobre el desarrollo de los nervios es incompleta, sin embargo, los datos que existen nos permiten reconstruir parcialmente este proceso. El desarrollo del sistema nervioso sigue una secuencia temporal de migración celular, división, diferenciación y degeneración. El número de neuronas en los ganglios maduros es una función de cada uno de estos procesos.

Utilizando timidina marcada con tritio trasplantada en el tubo neural de embriones de pollo, Weston ha empleado la autoradiografía para seguir la migración de las células neurales a las raíces dorsales de los ganglios simpáticos. La migración ocurre a las 65-80 horas y entre las 70-90 horas -- a observado que se agregan células destinadas a componer el



sistema nervioso. La migración de células en el conejo tienen una ultraestructura característica con neurotúbulos y filamentos finos. Se les han llamado neuroblastos migratorios. Rápidamente cuando llegan al lugar de formación estos neuroblastos crecen y presentan prominencias y organelos incluyendo el aparato de Golgi y neurotubulos y toman la forma de neuroblastos bipolares. La diferenciación posterior resulta en una transición de neuroblasto bipolar a seudounipolar y/o un aumento en la abundancia de organelos internos. El producto de estas series es cambios en la neurona inmadura. Aunque todas las células deben pasar por estos cambios no existen pasos característicos, al mismo tiempo, pueden aparecer en el ganglio células con distintos tipos de diferenciación. En adición a esta variación de célula a célula los ganglios representan diferenciaciones regionales entre dos y medio y tres días de incubación. Al microscopio se observan neuroblastos bipolares en la parte ventrolateral del sistema nervioso. Estas neuronas diferenciales se distinguen de las medio dorsales que se localizan en la parte medio dorsal de los ganglios y se diferencian en un tiempo más largo, extienden sus neuritas y para el sexto día se ha establecido una conexión central y periférica. Estas células son las que responden específicamente al Factor del -

Crecimiento Nervioso. Comparaciones al microscopio de luz y en ultraestructuras nos dan mayor información del tiempo de desarrollo dentro de los ganglios; en el cuarto día de desarrollo embrional los ganglios espinales contienen células migratorias y bipolares, al quinto día son más numerosas y algunas están presentes en la región medial medio dorsal poco a poco se van haciendo prominentes en los siguientes días y finalmente se identifican por el séptimo y medio día. Del octavo al doceavo día los neuroblastomas maduros - presentan substancia de Nissl aumentada y neurofibrillas -- que son positivas para el colorante de plata. Aunque no se ha estudiado adecuadamente a un nivel ultraestructural este período probablemente corresponde al paso de estas substancias de la forma final bipolar. La evidencia primera de la inervación funcional de estas células aparece durante este período; durante el doceavo y quinceavo día las células medio dorsales y ventro laterales continúan creciendo y madurando, al quinto día existen dos poblaciones perfectamente distinguibles. Los ganglios contienen algunas neuronas de la etapa bipolar final y muchas de la etapa pseudopolar unipolar. Justo en las células neuronales de los ganglios maduros se diferencia la morfología. Células satélites aumentan en número durante el desarrollo diferenciándose e indiferen

ciándose en una mitosis tardía de células satélites. Las células de alrededor en el décimo día se encuentran perfectamente desarrolladas y aparece un tejido-conectivo. El aumento en el número de células en la división de los ganglios después de que cesa la migración es debida a la división celular. La división de células neuronales medida por cuentas mitóticas probablemente ocurre por las células bipolares. - Las mitosis son más frecuentes en el quinto o sexto día y cesan entre el séptimo y octavo día. Mas adelante todas las células se dividen y se forman - en satélites, una degeneración de células neuronales - ocurre durante el desarrollo normal del sistema nervioso. En los pollos este fenómeno se evidencia a - los cuatro y medio días, con un pico entre cinco y seis días y desaparece al séptimo día. La degeneración más pronunciada en los ganglios se ve en la región ventrolateral. Se observa amputación en la parte final de los ganglios y algunos ganglios presentan -- atrofia en las células medio dorsales al octavo día. El estudio de esta degeneración sugiere que es un - proceso que corresponde periféricamente y no proviene de continuo crecimiento y mantenimiento de las neuronas.

## Efecto del Factor del Crecimiento Nervioso sobre estos procesos

Repitiendo y extendiéndolos en los experimentos de --- Bueker, Levi-Montalcini y Hamburger en los trasplantes de sarcoma de ratas 180 o 37 en los embriones de pollo, se --- observa el efecto de esta substancia. Al séptimo día las fibras nerviosas invaden el tumor y las células medio dorsales de los ganglios han crecido y presentan marcado crecimiento diferenciacional. Las células ventrales no tienen -- respuesta somática al tumor en los siguientes días, un aumento en el número de fibras nerviosas invaden al tumor sin tomar contacto con las células neoplásicas y el ganglio sigue creciendo. Quince días después, el tumor y sus células, han crecido dos veces y el número de células es 1 a 2 en relación a los controles. La cuenta celular en estos estudios incluye todas las células, sin mencionar este aumento en número y tamaño de las células no neuronales. Adicionalmente el número de células no se correlaciona con el diámetro de las mismas, después del tratamiento con el Factor del Crecimiento Nervioso. Con esto se puede fallar en sobreestimar el número de células. Una fuente purificada de Factor del Crecimiento Nervioso puede ser inyectada en los embriones -

del séptimo al décimo día y de nuevo aumenta el número de células medio dorsales en número y tamaño. Un efecto adicional para estudiar el Factor del Crecimiento Nervioso viene de las técnicas desarrolladas para monitorar sus efectos -- " in vitro " cuando se toman células de embrión de pollo y se llevan a un medio semisólido en cultivos de tejido de sarcoma 180 ó 37. Presentan un halo de neuritas en las 24 horas, este crecimiento no ha sido observado en tubos de cultivo donde los sarcomas no se han incluido. La prueba de la substancia del tejido y su capacidad para causar crecimiento de neuritas de ganglios que se expanden, constituyen una manera muy certera de ensayar el Factor del Crecimiento Nervioso. La apariencia de estos ganglios demuestran la uniformidad de anillos de largas neuritas que aparecen en las subunidades biológicas y equivale a 10 nanogramo por mililitro de Factor del Crecimiento Nervioso siendo necesario para que la respuesta llegue al máximo. Disminuyendo la concentración de esta substancia, una disminución progresiva en la densidad del anillo de las neuritas, se observan en los ganglios y no difieren de los controles. A niveles de 10 a 100 unidades el crecimiento no es detectable y no se inhibe pero aparece una reorientación en la cápsula de las neuritas alrededor de los ganglios.

Un número de estudios " in vitro " con ganglios-  
ntactos y disociados han ayudado a clarificar el -  
fecto del Factor del Crecimiento Nervioso en el --  
istema nervioso. Las células medio dorsales de los-  
anglios de pollo cultivados sobreviven en mayor nú-  
ero y aumentan de tamaño de los controles cuando -  
el Factor del Crecimiento Nervioso está presente.

Las células ventrales pobremente responden al --  
cultivo y fallan en crecer o presentan disminución -  
le crecimiento cuando no está presente el Factor --  
del Crecimiento Nervioso.

A nivel estructural, el tratamiento con esta --  
substancia, hace que el aparato de Golgi crezca, --  
crece el número de ribosomas y el retículo endoplás-  
ico, abundan los filamentos y ocasionalmente lo neu-  
rotúbulos. La disociación ganglionar indica que la --  
importancia de esta substancia en las células blanco-  
cuando el Factor del Crecimiento Nervioso está pre-  
sente en los cultivos, resulta en un cultivo de --  
crecimiento y sobrevive grande contra los controles -  
donde existe degeneración y muerte al final del se-  
gundo día. Observaciones similares se han reportado -  
para disociación del sistema nervioso de ratón y rata.

## Análisis del efecto del Factor del Crecimiento Nervioso sobre los ganglios nerviosos

La respuesta embriológica al Factor del Crecimiento Nervioso es de hiperplasia e hipertrofia. Tres argumentos nos pueden ayudar a darnos cuenta del aumento del número de neuronas en los ganglios tratados y del aumento del número de mitosis en los neuroblastos. El Factor del Crecimiento Nervioso induce la diferenciación de los neuroblastos en una población de células y aumenta el número de células sobrevivientes. Levi-Montalcini y sus colegas han propuesto que esta substancia actúa aumentando la actividad mitótica de los neuroblastos. En el implante del tumor y sus experimentos descritos antes, las mitosis continúan desde el quinto hasta el séptimo día. No existe identificación de células para figuras mitóticas, las mitosis son más frecuentes durante el período temprano en ambos experimentos y el control de ganglios de acuerdo al número total de mitosis es mayor. De manera importante del quinto al quinto y medio día, la cuenta en los ganglios experimentales eran las mismas y un poco menor que aquellos en los ganglios controles. Unicamente del sexto y medio al séptimo día los embriones tratados presentaron un aumento del 50% en el número de mi-

tos. Estos datos sugieren que el Factor del Crecimiento Nervioso no afecta la mitosis de la misma manera que el neuroblasto. Como se ha mencionado, la actividad mitótica de las células neuronales en la región dorsal, es máxima del quinto al sexto día y cesa esencialmente a los siete días. De nuevo los experimentos en ganglios indican actividad mitótica aumentada únicamente después de que aparece el pico de división neuroblástica y cerca del punto más alto cesa. Las células que continúan dividiéndose después del séptimo día, se supone que son elementos, soportes o células satélites. La actividad mitótica aumentada en el séptimo día y las fibras nerviosas invaden el tumor y crecen las células medio dorsales. Es posible que estas mitosis correspondan a la división de células satélites que responden al aumento de tamaño y actividad metabólica de las células neuronales que las rodean. La hiperplasia de los ganglios se obtiene inyectando Factor del Crecimiento Nervioso en embriones de pollo del séptimo al décimo día de edad. De nuevo después de este tiempo la actividad mitótica se observa en los neuroblastos. Evidencia contra cualquier efecto del Factor del Crecimiento Nervioso para perturbar en cualquier orden decreciente las mitosis neuroblásticas, no se han observado disociación ganglionar. La actividad mitótica en células --



neuronales de los tejidos de cultivo en el séptimo día son raras y no influyen en ellas el Factor del Crecimiento Nervioso. Hasta ahora no hay evidencia convincente de que el Factor del Crecimiento Nervioso aumente las mitosis en las células neuroblásticas. Evaluación mayor de estas sustancias se beneficiará con el uso de timidina marcada con tritio para métodos autoradiográficos. El Factor del Crecimiento Nervioso aumenta la indiferenciación pluripotencial de población de células en los ganglios y neuroblastos. Los precursores actuales de las células sensoriales son neuroblastos migratorios y marcan ya diferenciación neuronal, por esta sola presencia, los argumentos en contra se invalidan. Las pruebas actuales de que los neuroblastos migratorios son la única fuente de neuronas sensoriales son bastantes. En experimentos designados específicamente para distinguir el efecto del Factor del Crecimiento Nervioso en reclutamiento versus mantenimiento de la viabilidad neuronal; -- Charlwoo y colaboradores, razonan que el Factor del Crecimiento Nervioso fué importante para el reclutamiento, retrayendo los ganglios con esta substancia que aumenta el número de neuronas. Estas neuronas no requieren más Factor del Crecimiento Nervioso y se desarrollan como neuronas en presencia-ausencia del medio de cultivo. La hipótesis alternan

te es que esta sustancia mantiene la viabilidad neuronal. En cualquier caso el número de neuronas viables se puede es timar de la extensión de las fibras fuera del tejido. Para realizar estos experimentos se toman ganglios pretratados con o sin Factor del Crecimiento Nervioso " in vitro " y se cuenta el número de fibras que salen de los ganglios des---pués de 24 horas, en medio de cultivo con o sin Factor del Crecimiento Nervioso, estas neuronas, se encuentran en el número de fibras.

Los análisis estadísticos indican que el Factor del -- Crecimiento Nervioso sí es importante para mantener la viabilidad neuronal. Ningún otro dato adicional se ha obtenido para corroborar la hipótesis de que el Factor del Crecimiento Nervioso interviene en el reclutamiento de las neuronas. Estudios de las células disociadas a los ocho días en el em brión de pollo " in vitro " demuestran que el aumento del número de neuronas se encuentran en los tejidos tratados. Estos resultados indican el mantenimiento de la viabilidad por el Factor del Crecimiento Nervioso, porque esta substancia no tiene efecto en el número de células no neuronales y en la actividad mitótica de ninguna célula no neuronal. Una investigación completa de la respuesta hiperplásica de los ganglios sensoriales al Factor del Crecimiento Nervioso se-

está llevando a cabo. La evidencia sugiere que este factor aumenta la actividad neuroblástica de las células pluripotenciales del neuroblasto. El mantenimiento de la viabilidad por el Factor del Crecimiento Nervioso " in vitro " ,-- sugiere que se acompañe a estos efectos " in vivo " de tal manera que el mantenimiento de las células medio dorsales - en los ganglios tratados, resulta de un número de la sobrevivencia de las neuronas de los ganglios arriba de los controles, con un aumento del número de neuronas detectadas. - Aunque esta explicación es atractiva y consistente con los datos experimentales no se encuentran datos de degeneración de las células medio dorsales en los estudios originales. - Existen dos posibilidades para explicar esta discordancia, - la hiperplasia detectada puede ser artificial en parte y debido a una sobreestimación en el número de células creadas, por el aumento de resultados con los tratamientos del Factor del Crecimiento Nervioso que no se ha tomado en cuenta.

Una discusión general de esta fuente de error recientemente ha aparecido. Otra posibilidad adicional es que la degeneración de células medio dorsales puede ocurrir, pero su proceso es difícil para documentarse por técnicas histológicas standar.

Examen posterior de estas posibilidades parece justifi

do y probablemente requiere un estudio cuidadoso de cuentas de neuronas durante el curso de desarrollo de las neuronas embrionicas en el pollo. Examinando ambas posibilidades decidirá si el Factor del Crecimiento Nervioso previene a degeneración de las células medio dorsales en las neuronas simpáticas, este último punto se discutirá más adelante.

Los neuroblastomas medio dorsales normalmente presentan aumento de la diferenciación entre los ocho y doce días de la vida embrionica y por el onceavo día hay evidencia de que la inervación funcional aparece en alguna de estas células. Sin embargo, en la presencia de sarcomas implantados, las neuritas entran a los tumores en el séptimo día aumentando el tamaño y el estado de diferenciación responsable de las células medio dorsales. Levi-Montalcini y Hamburger incluyeron que las respuestas histológicas al Factor del Crecimiento Nervioso es una aceleración diferencial, esencialmente todos los estudios subsecuentes han ocurrido. Al nivel ultraestructural el Factor del Crecimiento Nervioso, produce de manera temprana características donde las jóvenes neuronas crecen hacia afuera en sus neuritas, desarrollándose y aumentando la prominencia del aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y aumentando el número de neurofilamentos y neurotúbulos.

Una apreciación final del papel del Factor del Crecimiento Nervioso en la vida de las neuronas sensoriales debe esperar aclarar muchos detalles básicos de la acción entre las neuronas y el factor. Por lo pronto nuestro conocimiento del período durante el cual las células responden a este factor es incompleto. Todo mundo está de acuerdo que el crecimiento de las neuritas de los ganglios " in vitro " está limitado por la vida embrionaria. Este factor y otros datos sugieren que las células sensoriales responden al Factor -- del Crecimiento Nervioso únicamente durante el período ---- embrionario, las células en el período post-natal de la ratita y el ratón, indican que también hay dependencia de este factor. Esta discrepancia se encuentra y hasta la fecha no ha sido explicada tal vez las fibras no crecen en los ganglios post-natales en respuesta al Factor del Crecimiento Nervioso sino que tienen dificultad en penetrar en la pared de las células satélite y en el tejido conectivo durante este tiempo. Estas barreras físicas no se presentan en los ganglios disociados y serían más fácil reconocer. Otras hipótesis se pueden construir, una propuesta por Varon y colaboradores, indican que la demostración que el Factor del -- Crecimiento Nervioso no actúe sobre las neuronas, puede ser substituída en producción de fibras y sobrevivencia de neu-

ronas en cultivos de tejidos. Este propósito, de las células no neuronales determinan que cantidad de tejido exógeno y Factor del Crecimiento Nervioso aparece para soportar los ganglios, es inadecuado para poder sostener por sí solo y caracterizar las respuestas del Factor del Crecimiento Nervioso. Exámenes posteriores de este tipo a diversos niveles de respuesta neuronal durante la vida embrionaria y la vida post-natal en los ganglios disociados, puede indicarnos el uso de el Factor del Crecimiento Nervioso y su acción en el crecimiento de neuritas y en la interacción y no neuronas. Estos experimentos son útiles también para explicar las implicaciones del Factor del Crecimiento Nervioso que produce un transporte retrógrado de los axones de la periferia al cuerpo de las células en las neuronas, tanto en la vida adulta de la rata, sin efectos morfológicos. Concluyendo, el análisis del Factor del Crecimiento Nervioso en los ganglios sensoriales, sugiere que su efecto post-mitótico se refiere a la línea neuronal y actúa para mantener las neuronas vivas y acelerar su maduración.

## Desarrollo del Sistema Nervioso Simpático

Revisiones detalladas de esta materia se han publicado recientemente y han de ser consultadas para datos adicionales para una discusión del desarrollo de las neuronas pre-anglionares. El desarrollo del sistema nervioso en gallinas y mamíferos es similar, pero la aparición temprana de catecolaminas en neuroblastos embriónicos y la maduración de la especie varía de una a otra. El desarrollo del simpático empieza con la migración de las crestas neuronales ventrales en el mesénquima entre el tubo neuronal y el miotomo. Estas células toman lugar en dos columnas dorsolaterales, formando las cadenas simpáticas primarias. En este sitio es donde las células simpáticas primitivas dan primera evidencia de la habilidad de sintetizar y almacenar catecolaminas como se indica por histoquímica y técnicas de fluorescencia y por la aparición de unos gránulos densos. De las cadenas primarias las células simpáticas emigran a un lugar grande de localizaciones, una conexión emigra ventralmente para formar los ganglios prevertebrales simpáticos que innervan las víceras abdominales y los ganglios pélvicos que contienen las llamadas células adrenérgicas cortas, las células cromafílicas primitivas que se destinan para la médula

adrenal o para los sitios extra adrenales que son inicialmente parte de esta cadena ventral. Los ganglios paravertebrales simpáticos resultan de la migración de células dorso laterales de la cadena simpática a un punto de la situación media de los nervios espinales. Las células que emigran de la parte apical de las cadenas primarias se juntan con las regiones de la cabeza de la cadena simpática cervical. La extensión de las neuritas se conecta con el segmento que se agrega en la célula neuronal convirtiéndose en una cadena paravertebral. Los crecimientos de los grupos axonales y las neuronas simpáticas se conectan en sus órganos terminales al tiempo de que una inervación ha madurado el aparato variando enormemente de un órgano a otro. El procedimiento de migración celular y su división, diferenciación y degeneración determina el número de neuronas de las células maduras ganglionares. La migración celular de las crestas neuronales no indica diferencias morfológicas de neuronas simpáticas entre la llegada a la cadena primitiva. Sin embargo, hay evidencia que en los eventos importantes, críticamente para su diferenciación, no ocurren durante la migración. Nkorr ha mostrado que la diferenciación de las células de la cresta en los blastos requiere que las crestas estén intactas con su mesénquima somática. Para ser efectivos se ha



encontrado que el primero debe estar condicionado al estímulo del crecimiento del tubo neuronal. El Factor del Crecimiento Nervioso no puede mimetizar la respuesta neuronal; a este respecto se ha demostrado también que los neuroblastos simpáticos continúan en la presencia del tubo neuronal ventral para sobrevivir. Con respecto a las funciones de sobrevivencia el tubo neuronal puede ser reemplazado por el Factor del Crecimiento Nervioso. Los simpatoblastos más inmaduros que pueden ser identificados, los que poseen una gran cantidad de gránulos densos se les llama células de Stin. Estas células tienen moderado citoplasma polimosoma lleno y una cisterna de réticulos endoplásmicos y un pequeño aparato de Golgi. Las células en este estado de diferenciación aparecen predominantemente en los ganglios simpáticos en el sexto día en los embriones de pollo y en los ganglios cervicales superiores del ratón recién nacido. Las células de Stin crecen diferenciándose de las células principales, estas células son las neuronas noradrenérgicas de los ganglios simpáticos. Las células principales son más grandes que las primeras y tienen organelos más prominentes incluyendo un aparato de Golgi más desarrollado y retículo endoplásmico más rugoso. Los gránulos densos se encuentran en el pericardio de las células principales maduras. Sus axo-

nes contienen gránulos y neurotubulos y neurofilamentos. La división de las células con ácido desosiribonucleico se detiene al octavo día del desarrollo ganglionar de los ganglios de los pollos; la división celular se completa con crecimiento en el ganglio cervical superior de la rata. La división celular después del período de neuroblastos es más baja en el ácido dexosiribonucleico y son probablemente células de sostén. Paralelamente la degeneración que ocurre durante el crecimiento del sistema nervioso se ha observado en experimentos recientes. Un 30 % disminuye en el número de neuronas durante el desarrollo normal del ganglio cervical superior de la rata.

#### Efecto del Factor del Crecimiento Nervioso en el Sistema Nervioso Simpático

Los sarcomas implantados de los experimentos de Levi-Montalcini y Hamburger demuestran que los ganglios simpáticos de las gallinas responden al Factor del Crecimiento Nervioso, con hipertrofia e hiperplasia. Los ganglios simpáticos de la rata, ratón y conejo, responden de la misma manera. En un estudio reciente, la inyección en ratas del nacimiento al quinto día con cien unidades por gramo resultó en

un aumento de 3.5 en el volumen del ganglio cervical superior. El diámetro de la neurona y el número de ellas subió 1.3 veces, similar a las neuronas sensoriales en su respuesta al Factor del Crecimiento Nervioso. Todas las neuronas simpáticas no tienen una subpoblación en la cual ocurre sino adicionalmente la respuesta hipertrófica a este factor se presenta persistentemente en la vida adulta. Los cambios que se observan en el microscopio de luz y en las estructuras a nivel ultramicroscópico indican la aceleración y diferenciación que resulta de la exposición de las neuronas simpáticas al Factor del Crecimiento Nervioso, las células y los núcleos en su diámetro aumentan a los valores del adulto después de cinco días de tratamiento. La estimulación de las neuronas desarrollan un aumento notable del retículo endoplásmico y aparato de Golgi con un dramático aumento en los neurofilamentos y neurotubulos. El Factor del Crecimiento Nervioso aumenta el tamaño de las neuronas adultas acompañándose con hallazgos similares ultraestructurales. La fluorescencia por histoquímica ha completado las técnicas morfológicas para analizar los efectos del Factor de Crecimiento Nervioso en la distribución del simpático y nervios periféricos. Un aumento notable en la densidad de las inervaciones adrenérgicas en el iris, glándula submaxilar, glán

dula parótida y vasos sanguíneos, plexos ganglionares, tubo intestinal y otros órganos aparecen en el tratamiento del ratón recién nacido. Los mismos hallazgos se encuentran en el adulto ratón. La estimulación colateral de axones intactos maduros ofrecen una manera para revisar la densidad de los plexos terminales en los animales adultos.

El aumento de electricidad de la fluorescencia en los nervios periféricos se refleja bioquímicamente en niveles elevados de norepinefrina, los niveles elevados de norepinefrina en los ganglios simpáticos y en sus tejidos periféricos. Después de la administración del Factor del Crecimiento Nervioso se encuentra una inducción selectiva de síntesis de norepinefrina-tiroxina-dopamina. La literatura extensamente habla del desarrollo normal de éstas enzimas y de los efectos del Factor del Crecimiento Nervioso recientemente han sido revisados. Los ganglios simpáticos de los embriones de pollo cultivados "in vitro" con Factor del Crecimiento Nervioso presentan el mismo crecimiento exuberante de las fibras como se ve en el desarrollo neuronal animal. En los niveles de microscopio de luz y electrónico los ganglios contienen neuronas simpáticas maduras. El Factor del Crecimiento Nervioso se ha observado que es esencial para viabilidad y disociación de las células simpáticas y su cre

cimiento y formación ulterior.

### Análisis del Factor del Crecimiento Nervioso en el Sistema Nervioso Simpático

Una gran cantidad de teorías se han adelantado para explicar la hiperplasia neuronal, en los embriones ganglionares tratados con Factor del Crecimiento Nervioso. Los primeros argumentos indicaban que la estimulación era por la actividad mitótica en los ganglios y tiene poca documentación. Estudios recientes utilizando timidina marcada y autoradiografías indican que las células se dividen completamente al nacimiento del ratón y que el Factor del Crecimiento Nervioso inyectado después del nacimiento no causa mayor actividad mitótica. Las mitosis que aumentan se observan en estudios iniciales y se deben a la proliferación esperada de células no neuronales que acompañan el aumento de las fibras en el tratamiento. Para investigar el efecto del Factor del Crecimiento Nervioso en las mitosis, los estudios de autoradiografía deben ser llevados a cabo en animales jóvenes y el número de mitosis contadas. Numerosas células iniciales se han encontrado en los ganglios simpáticos de los mamíferos después del nacimiento. Zaimis y Papadaki han presentado --

evidencia que un crecimiento rápido de éstas células en neuronas maduras que se reconocen con microscopio de luz e indica el aumento de número de neuronas conectadas después de la administración del Factor del Crecimiento Nervioso. Otros estudios soportan la idea de que este aumento es en parte debido a este fenómeno; no hay evidencia de la conversión de las células no neuronales bajo la influencia de este Factor.

Un elemento importante del Factor del Crecimiento Nervioso en el mantenimiento de la viabilidad neuronal se ha observado de estudios "in vitro" por Hendry y Campbell que demostraron que el Factor del Crecimiento Nervioso administrado a ratas recién nacidas previene la disminución normal del número de neuronas que ocurre del resultado de una degeneración durante los primeros meses de vida posnatal, de tal manera que el aumento del número de neuronas que se observa después del tratamiento se debe a ambos fenómenos, aceleración de la maduración y aumento en el número de neuronas que sobreviven.

El Factor del Crecimiento Nervioso produce primero cambios morfológicos en los ganglios simpáticos del pollo y nos da la conclusión de que el período de división neuroblástica y neuronas inmaduras extendiendo sus neuritas por

la acción de este factor en los ganglios de los mamíferos ocurren de la misma manera. Parece ser que estas neuronas sensoriales son afectadas después de la mitosis y actúan para mantener su viabilidad y acelerando su maduración.

### Factor del Crecimiento Nervioso y Neuronas Cortas -- Adrenérgicas

La localización de los ganglios simpáticos pélvicos -- cerca de los órganos del tracto genitourinarios y su relación a motivado que sus neuronas puedan ser de corto tamaño adrenérgico. Estas neuronas cortas no responden al Factor del Crecimiento Nervioso y a su antisuero en una serie de estudios. Sin embargo, estudios recientes han indicado que una dosis alta del Factor del Crecimiento Nervioso produce un desarrollo marcado en las vías deferentes de la rata recién nacida. Adicionalmente, el Factor del Crecimiento Nervioso se observa que se estimula débilmente y su antisuero inhibe fuertemente la degeneración de los axones de estas células después de ser lesionadas con hidroxidopamina (6-OH DA). Por lo tanto son menos sensitivos que las neuronas largas adrenérgicas de los ganglios paravertebrales y prevertebrales intactos y son lesionados por la aparición de la res

puesta del Factor del Crecimiento Nervioso.

### Factor del Crecimiento Nervioso y la Médula Adrenal

Igual que las neuronas adrenérgicas cortas, los feocromocitomas adrenales son mucho menos sensitivos al Factor del Crecimiento Nervioso que las neuronas adrenérgicas largas. Dosis altas de este factor indican hipertrofia de la médula adrenal. Estos cambios están acompañados por aumentos de niveles de catecolaminas por un aumento de la fluorescencia histoquímica. La caracterización posterior a la respuesta debida al Factor del Crecimiento Nervioso puede dar lugar a ulteriores trabajos para el mejor entendimiento de las implicaciones de los resultados recientemente hallados, de cesación de la división celular y extensión de los procesos en los feocromocitomas de rata en respuesta al Factor del Crecimiento Nervioso.

### Lesiones del Sistema Nervioso Simpático - Respuesta de Lesiones en Neuronas al Factor del Crecimiento Nervioso

Las neuronas simpáticas continúan creciendo a través de la vida. Neuronas intactas presentan ramificaciones cola



terales en la presencia de nervios denervados trasplantados de fibras simpáticas. Lesiones químicas o quirúrgicas en -- los axones indican que existe regeneración de los tejidos -- denervados que afectan nervios de otros ganglios simpáticos incluso de neuronas noradrenérgicas centrales. Ahora revisa<sup>u</sup>remos brevemente la naturaleza de las lesiones producidas -- en respuesta al Factor del Crecimiento Nervioso.

Factor del Crecimiento Nervioso antisuero - inmunosimpatectomía. Inmunosimpatectomía, es el nombre que se le ha dado para describir la destrucción notable de las neuronas simpáticas por un anticuerpo al Factor del Crecimiento Nervioso. Indicaremos algunos de los principales eventos que -- ocurren en este trabajo y referiremos al lector a estudios -- recientes para detalles adicionales.

La destrucción de las neuronas por el antisuero del -- Factor del Crecimiento Nervioso se presenta en las etapas -- prenatal y posnatal. La inyección en mamíferos del Factor -- del Crecimiento Nervioso, produce la muerte y degeneración -- celular que se ve en gran número dos o tres días después de la primera inyección. A los 20 días los ganglios se reducen a nódulos escleróticos comprendiendo solo unas pequeñas células satélites y neuronas pequeñas. Los animales trata-- dos se ven de buena salud pero mucha de su actividad fisio-

lógica requiere de reflejos simpáticos y son anormales.

Levi-Montalcini y colegas han identificado los núcleos y observado el sitio del daño neuronal. Los componentes nucleares se condensan y se desorganizan después de 12 horas. Los cambios nucleares se consideran comparables a aquellos vistos por el bloqueo ribosomal de las síntesis de ácido dexosirribonucléico. Otros cambios de los anticuerpos consisten en la corrugación de la membrana plasmática, desaparición de las mitocondrias y del retículo endoplásmico. Los mismos resultados se observan en ganglios tratados con antisuero "in vitro" y complementan en lo esencial esta investigación.

El microscopio de fluorescencia para órganos periféricos inervados por el cervical superior y ganglios estrellados indican que desarrollan fibras después del tratamiento con antisuero. Se reporta también una depresión marcada del contenido de norepinefrina en estas localizaciones; igualmente los niveles de tiroxina hidroxialanina y dopamina se disminuyen en las ratas recién nacidas y en los ratones en el ganglio cervical superior después del tratamiento con antisuero hay una depresión de ácido ribonucléico y síntesis protéica, en el metabolismo de la glucosa y en la transmisión de impulsos nerviosos.

Los ganglios simpáticos de los adultos tratados con antisuero presentan una disminución de volumen que se atribuye a la atrofia neuronal y no a la destrucción neuronal. Los tejidos periféricos demuestran una disminución de norepinefrina y hay desaparición de los ganglios adrenérgicos. Tres meses después los índices de función simpática han retornado a lo normal o cerca de lo normal.

El mecanismo por el cual el antisuero actúa es desconocido. La hipótesis más favorable es que los anticuerpos se unen con el Factor del Crecimiento Nervioso e impiden que éste actúe o que los anticuerpos participan en su efecto citotóxico uniéndose al Factor del Crecimiento Nervioso en la superficie de los ganglios simpáticos, aunque no hay pruebas concluyentes en ninguno de los sentidos.

Simpactectomía Quirúrgica. El paso de fibras adrenérgicas al adulto resulta en la degeneración de las fibras periféricas en la lesión y en la aparición de respuesta en el cuerpo celular. Este último consiste en la absorción de la periferia, migración de los núcleos a una posición excéntrica y fragmentación y dispersión de las substancias de Nissl. Estudios del desarrollo del ganglio cervical superior en la rata, indican un 30 % de caída en el número de neuronas y la pérdida mayor ocurre entre los 6 y 28 días después del -

nacimiento. La lesión de los axones antes del doceavo día - indican la atrófia marcada del ganglio, disminución de la proteína y su contenido y sus actividades de hidroxilasa tiroxina y carboxilasa dopa. El corte del axón después de 21 días resulta en una disminución del contenido de proteínas - sin cambios a nivel de las enzimas esto último es el resultado de ganglios en el adulto. Estos resultados indican que el período entre 12 y 21 días está caracterizado por maduración de éstas neuronas. La coincidencia entre la maduración bioquímica con la aparición de los resultados del adulto - en la administración sugiere que hay un contacto entre terminaciones del órgano y tiene lugar en parte en este proceso.

El corte del axón al sexto día indica la destrucción - del 90 % de las neuronas que originalmente se presentan en los ganglios, sin embargo cuando el Factor del Crecimiento Nervioso se administra entre el sexto y veintiun días el número de células que mueren se reduce sustancialmente. El -- Factor del Crecimiento Nervioso por lo tanto mantiene la -- viabilidad de las relaciones neuronales que de otra manera hubieran muerto aumenta la sobre vida y se acompaña por el mismo número de maduración acelerada que se ve las células - no lesionadas.

Simpactectomía Química. Tranzer y Thoenen han demostrado que la 6-OHDA causa una regeneración reversible selectiva de los axones terminales de las neuronas adrenérgicas periféricas, la destrucción de éstos compuestos se debe a su acumulación en las neuronas periféricas con una oxidación en las macromoléculas. El Factor del Crecimiento Nervioso produce una estimulación en esta regeneración de las fibras adrenérgicas después de la administración de esta sustancia química por histoquímica y fluorescencia y por un acelerado recubrimiento de norepinefrina periférica. El Factor del Crecimiento Nervioso temporalmente impide esta degeneración.

La administración de la 6-OHDA a animales recién nacidos produce una destrucción masiva y permanente de ganglios neuronales paraventrales y preventrales. Se marca mucho la administración consistente de Factor del Crecimiento Nervioso previene la muerte celular y resulta que no hay diferencia en los ganglios en el número y la neurona en aquellos tratados con Factor del Crecimiento Nervioso solo. Otros agentes químicos que acaban de destruir las neuronas simpáticas neonatales son la guanetidina y la visplantina. La destrucción afecta ambas drogas y se suprime por administración concomitante del Factor del Crecimiento Nervioso. No

sabemos como el Factor del Crecimiento Nervioso previene la muerte de las neuronas simpáticas tratadas con estos agentes. Se ha sugerido que ambas, el corte del axón y la destrucción química del axón deprivan al sistema nervioso simpático de un factor trófico de su periferia. Aparentemente el Factor del Crecimiento Nervioso reemplaza a este factor y ayuda para su recubrimiento.

Factor del Crecimiento Nervioso y Sistema Nervioso Central. La fluorescencia histoquímica a hecho posible analizar la distribución de muchas aminas mono adrenérgicas y sus caminos al sistema nervioso central. Dos principales grupos - de catecolaminas que contienen neuronas se han encontrado. Uno es la productora de norepinefrina y otra es la productora de dopamina. Las neuronas que contienen 5 hidroxitriptamina también se presentan axones tratados de las neuronas catecolaminérgicas y presentan una regeneración sorprendente. El transplante de los tejidos adrenérgicos puestos en contacto con axones recortados se reinervan. El Factor del Crecimiento Nervioso ha indicado que estimula esta regeneración y evidencia una aceleración en la aparición de fibras en el transplante. Adicionalmente, la inyección intracerebral del antisuero al Factor del Crecimiento Nervioso reduce la regeneración y el recontacto con los axones. Por lo

tanto se sugiere que el Factor del Crecimiento Nervioso o una sustancia similar normalmente tiene lugar en un papel importante en el crecimiento y regeneración de estas neuronas. Las implicaciones funcionales de esta regeneración no han sido determinadas.

Ninguna evidencia se ha obtenido de un efecto del Factor del Crecimiento Nervioso en el desarrollo del sistema nervioso central. Datos suficientes para concluir esto todavía se está recopilando. Estudios posteriores son necesarios para estar seguros de las implicaciones de los efectos del Factor del Crecimiento Nervioso en el sistema nervioso central. Importantes áreas de investigación deben incluirse en la determinación de esta fuente para saber su naturaleza y localización de los sitios donde se unen y las implicaciones morfológicas de su acción.

#### Mecanismo de Acción del Factor de Crecimiento Nervioso

¿Cómo actúa el Factor del Crecimiento Nervioso en las células y su respuesta? ¿Qué eventos moleculares se llevan a cabo en la interacción de estos efectos observados? Una respuesta comprensible a estos es imposible. Sin embargo, se han hecho algunos progresos para indicar el mecanismo de

acción del Factor del Crecimiento Nervioso. Revisaremos en esta sección estos estudios e indicaremos la presencia de receptores específicos al Factor del Crecimiento Nervioso - en los tejidos "blanco". La demostración de una terminación nerviosa y reacciones retrógradas que transportan el Factor del Crecimiento Nervioso a las células sensoriales y a las neuronas simpáticas también se discutirá. Las fuentes del Factor del Crecimiento Nervioso con las cuales se observan estas operaciones serán mencionadas y finalmente al metabolismo de los efectos de Factor del Crecimiento Nervioso se considerará.

### Receptores al Factor del Crecimiento Nervioso

Los resultados obtenidos con hormonas y neurotransmisores marcados con radioisótopos de una alta actividad específica nos han dado información de los sitios donde se unen - las macromoléculas y su reconocimiento con sitios de recepción que se encuentran en las membranas de las células. La medición del ligante y su interacción con el receptor debe satisfacer un cierto número de criterios: el ligante debe - retener la substancia y la actividad biológica del compuesto padre; la unión debe demostrar, debe ser reversible y su



afinidad con los sistemas biológicos y sus respuestas demostrados en sistemas intactos. La unión del ligante debe exhibir las estructuras específicas de estereotaxia del compuesto padre; y los tejidos que son dados a la respuesta deben estar en los sitios donde se unen.

En la práctica todos estos métodos usados para la marcación del Factor del Crecimiento Nervioso de los ratones, se han realizado con iodo 125 radiactivo y dan preparaciones que de alguna manera alteran las propiedades de fijación en los sitios de los tejidos del nativo Factor del Crecimiento Nervioso.

Utilizando una modificación del método de marcaje con cloramina T el Factor del Crecimiento Nervioso iodado preparado por Benajee y colaboradores indica que se retiene el 80 % en sitios de nativos de la substancia. Utilizando una fase sólida de modificación Frazier y colaboradores prepararon un Factor de Crecimiento Nervioso que retiene de un 10 al 20 % de la actividad predeterminada utilizando el Factor del Crecimiento Nervioso nativo. Modificándose en método de marcaje enzimático el Factor del Crecimiento Nervioso preparado por Herrup y Shooter retienen del 75 al 80 % de la actividad ligante nativa del Factor del Crecimiento Nervioso.

Estos últimos, Herrup y Shooter y lo mismo que Baner--

Jee, han encontrado que existe saturación, reversible, altos lugares, afinidades, disociaciones constantes y concentración del ligante a la mitad de los sitios donde se ocupan del rango de 10 a la de menos 10 molar; estos últimos grupos usan embriones de ocho días de nacidos y otros grupos ocupan membranas de plasma enriquecida en el ganglio cervical superior del conejo. Recientemente, utilizando intacto un embrión de pollo y su sensibilidad alta de receptores Sutter ha descrito dos clases de receptores que se saturan con disociación de  $10^{-11}$  molar y  $10^{-9}$  molar. Estas afinidades para ligarse se deben a la heterogenicidad de los sitios del receptor. No existen resultados de interacción cooperativa en los cuales la afinidad del receptor al ligante depende del grado de ocupación de otros sitios. La presencia de estereoisómeros y antagonista del Factor del Crecimiento Nervioso limita la substancia en su receptor y análisis del sistema, sin embargo estos mismos autores han demostrado que los sitios del ligante químico se alteran en proporción a su actividad biológica. Adicionalmente estos grupos no han podido demostrar ningún ligante del Factor del Crecimiento Nervioso y sus receptores por las neuronas.

Los resultados de Frazier y colaboradores contrastan en parte con los obtenidos por otros estudios utilizando ho

mogenados de embriones de pollo y células sensoriales que no se encuentran saturación. Adicionalmente los datos presentados sugieren cooperación interactiva entre el ligante y receptores que explican la afinidad múltiple a los sitios de recepción, finalmente la competencia de insulina con Factor del Crecimiento Nervioso indican una máxima inhibición a niveles de  $10^{-7}$  molar. La discrepancias entre los datos obtenidos por un grupo y los otros no han sido explicadas y se deben tal vez a características a las preparaciones de los receptores o por el distinto componente al marcar el Factor del Crecimiento Nervioso. Los receptores del Factor del Crecimiento Nervioso se encuentran en las células de una gran cantidad de tejido. Herrup, Shooter y Banerjee no han podido demostrar lugares específicos, otros que el sistema nervioso central y ganglios cervicales, sin embargo, Frazier y colaboradores han encontrado en el corazón y en el cerebro que también hay sitios de recepción y ultimamente en otros tejidos como en el neuroblastoma y en el melanoma es posible juzgar la importancia de estos últimos datos en la información concerniente al papel biológico del Factor del Crecimiento Nervioso en estos sistemas.

La localización subcelular de los receptores en el Sistema Nervioso Central de los ganglios simpáticos no ha sido

explorado en detalle; la mejor evidencia que los receptores están en las membranas plasmáticas y vienen de sitios de células intactas o comparaciones celulares enriquecidas por plasmas celulares. Los datos se completan con estudios de Frazier y colaboradores que demuestran en el bioensayo que es posible elucidar que las moléculas del Factor del Crecimiento Nervioso se une a las cefarosas. Hay pocos datos actualmente que caracterizan al receptor del Factor del Crecimiento Nervioso. La unión de los receptores dependen del calcio; la unión de los sitios de tripsina y proteína indican que la moietidad constituye una parte integral de la macromolécula del receptor. Recientemente un receptor del crecimiento nervioso se ha solubilizado de la membrana enriquecida del conejo usando tritón en por ciento y este resultado indica una mayor caracterización y está en estudio.

Herrup y Shooter reportan un desarrollo en el número de los factores en las células embriónicas paralelamente disminuido en ganglios intactos en respuesta al Factor del Crecimiento Nervioso "in vitro". Datos de otros sistemas hormonales han demostrado que existe una relación inversa entre la concentración del suero de una hormona y el número de receptores de las células que responden. Esta información no tiene ninguna relevancia en la regularización de

los receptores para el desarrollo y debe esperar mayores datos biológicos de los sistemas simples y para determinar -- las cantidades de Factor del Crecimiento Nervioso circulando en los tejidos en los diferentes estados embriónicos.

Una correlación aproximada de Factor del Crecimiento Nervioso se obtiene parcialmente, sin embargo, el fallo para observar una correlación exacta sorprende únicamente si uno se limita a las teorías de los receptores por los cuales las respuestas proporcionadas al número de receptores ocupados. Adicionalmente, la sensibilidad de varios ensayos-utilizados para determinar que tan cerca se correlacionan los datos biológicos. Por el presente la respuesta en el máximo de fibras del crecimiento de las neuronas sensoriales-"in vitro" aparecen correlacionadas con el número de sitios infinitos de  $10^{-11}$  molar de un 25 a 50 % en los ganglios -- sensoriales de las células descritas por Sutter y colaboradores. La implicación de la baja afinidad  $10^{-9}$  molar todavía no es clara.

Resumiendo, la unión del Factor del Crecimiento Nervioso marcado a sus receptores en las células sensoriales y -- simpáticas se caracteriza por una medida consistente en su efecto de mediador biológico. El efecto biológico de unirse a otros tejidos es desconocido al presente. Avances considera

rables para entender la importancia del Factor del Crecimiento Nervioso y su unión se están realizando en sus factores biológicos para las hormonas y deben ser mejor definidos en un futuro.

### Transporte en el Axón retrógrado del Factor del Crecimiento Nervioso

Hendry e Iversen han demostrado que quitando el órgano "blanco" del ganglio simpático de un ratón recién nacido da lugar a una disminución en la actividad de la tiroxina hidroxilasa dentro del ganglio. Este efecto puede ser prevenido introduciendo una forma de celulosa unida a un liberador lento del Factor del Crecimiento Nervioso en el sitio de donde se quitado el órgano "blanco". Estos resultados dan la sugerencia que el Factor del Crecimiento Nervioso es un importante factor trófico que es transportado retrógradamente a lo largo del axón al cuerpo de la célula de la neurona y ejerce ahí su efecto. Demostración de este flujo retrógrado ha sido hecha por Hendry y colaboradores, que demostraron que el Factor del Crecimiento Nervioso iodado inyectado en el ojo anterior del ratón adulto marcado por una fracción de células neuronales en el ganglio cervical superior-

que inerva al iris. Este transporte procede en saturación y es específicamente una forma activa del Factor del Crecimiento Nervioso. Este factor es parcialmente inactivado por oxidación de triptofano en sus residuos y transformado en una forma intermedia. Se supone que el transporte retrógrado es no específico como lo indican Stoeckel y colaboradores, la diferencia entre el transporte indica diferentes afinidades para los receptores de la membrana a la forma química modificada de Factor de Crecimiento Nervioso. La relación de estos sitios a los receptores específicos en el cuerpo de la neurona descritos en el capítulo anterior no es conocida aún. El análisis del Factor del Crecimiento Nervioso que llega al cuerpo de la célula por un transporte retrógrado en el axón indica que retiene su antigenicidad y su estructura covalente. Se localiza a lo largo de las estructuras recirculares en el citoplasma como se indica en el desarrollo del conjugado activo biológicamente con peroxidasa de caballo de mar.

El transporte retrógrado del Factor del Crecimiento Nervioso se observa que ocurre en las fibras simpáticas y sensoriales pero no en las fibras motoras. El proceso persiste a través de la vida tanto en unas como en otras neuronas. Aunque únicamente las neuronas simpáticas demuestran -

un discernimiento morfológico que responde al Factor del Crecimiento Nervioso más allá del período embriogénico. Las implicaciones de esta diferencia todavía deben ser determinadas. La importancia biológica del flujo retrógrado del Factor del Crecimiento Nervioso se ha demostrado en estudios utilizando ganglios del nervio cervical. Paravicini y colaboradores han demostrado que el Factor del Crecimiento Nervioso que llega al cuerpo de la célula por transporte retrógrado aumenta la actividad de la tiroxina hidroxilasa. Más aún la interrupción aparente de transporte retrógrado en el desarrollo de ganglios simpáticos por corte en el axón dan lugar a degeneración neuronal puede ser reversible por la administración del Factor del Crecimiento Nervioso exógeno. Estos resultados llevan al punto de la importancia de este factor para el desarrollo de respuestas en las neuronas y son consistentes con las hipótesis de que este factor es esencial como factor trófico para transportar de la periferia al cuerpo celular.

### Fuentes del Factor de Crecimiento Nervioso

Una fuente adecuada del Factor del Crecimiento Nervioso es necesaria para la operación tanto en los receptores -



de las células como en su flujo retrógrado. Este factor se distribuye ampliamente y se identifica en un número grande de especies de vertebrados superiores incluyendo al ser humano. Con técnicas radioinmunológicas este factor se ha detectado en el plasma y en todos los tejidos del ratón adulto. Aparentemente, únicamente el ratón adulto es el que tiene la concentración más alta en su glándula submaxilar. La síntesis del Factor de Crecimiento Nervioso en la glándula submaxilar del ratón adulto recientemente se ha demostrado e indica que es estimulada con testosterona y resulta en común acuerdo con la aparición de una concentración mayor en las células masculinas después de la pubertad. Bajo condiciones de síntesis activa de Factor del Crecimiento Nervioso en la glándula submaxilar, no puede detectarse ninguno de los otros órganos, esto sugiere que otros tejidos son capaces de iniciar o aumentar la síntesis de Factor derivado del que se mide el plasma después de que se quita la glándula submaxilar. Después de que disminuye notablemente este factor los niveles en el macho retornan a los valores preoperatorios 60 días después de que se quita la glándula submaxilar y se regeneran las fuentes del Factor del Crecimiento Nervioso. Aunque un aumento en las síntesis de otros tejidos se ha demostrado en estos estudios aun otras fuentes-

han sido sugeridas. La documentación en el pasado de este factor encontrada en los sarcomas de ratón 180 y -- 37 y en los tejidos granulomatosos se complementan -- por demostraciones recientes de que el Factor del -- Crecimiento Nervioso se sintetiza en tubos de cultivo de células 3T3 y en fibroblastos de las galli-- nas. Varon y colaboradores han demostrado convincente-- mente que las células no neuronales pueden substi--- tuirse al Factor del Crecimiento Nervioso en el ter-- mino de producción neuronal y en cultivos de teji-- dos disociados. La distribución local del Factor del Crecimiento Nervioso de las neuronas a una fuente -- glial indican y han sido demostradas recientemente -- por síntesis en células del glioma, por Longo L, --- Penhoet. El desarrollo en otros tejidos en la sínte-- sis de este factor se sugiere por el aumento cons-- tante descubierto en cultivos de médula adrenal y - músculo esquelético de rata. Un catálogo de tejidos-- y órganos capaces de sintetizar Factor del Crecimien-- to Nervioso y por su síntesis regular únicamente --- ahora empieza a verse claro. La clarificación de la -- naturaleza de esta síntesis, su almacenaje y su sali-- da requiere más estudio para comprender su acción.

## Efectos metabólicos del Factor del Crecimiento Nervioso

Muchos procesos metabólicos en los ganglios simpáticos y sensoriales se estimulan por este factor "in vitro" incluyendo la toma de glucosa y su oxidación, la incorporación de acetato a los lípidos, la toma de aminoácidos, la incorporación de proteínas, la incorporación de adenina y uridina entre ácido ribonucleico. Sin embargo en estudios subsecuentes de Partlow y Larrabee se ha demostrado a una inhibición completa de uridina que se incorpora al ácido ribonucleico por efecto de actiomicina D disminuyendo el crecimiento de las fibras moderadamente y ésta observación indica que los resultados del efecto secundario con el cual se inhibe el crecimiento de las fibras después de una declinación en la síntesis protéica. La importancia del papel de la síntesis de proteína se demuestra en un experimento secundario con el cual se inhibe el crecimiento de las fibras después de una declinación en la síntesis protéica debido a la presencia cicloheximida. Estos trabajadores concluyen -- que el Factor del Crecimiento Nervioso no induce al crecimiento de las fibras a través de una síntesis de ácido ribonucleico sino que actúan a nivel del traslado del ácido ribonucleico en una de sus proteínas más específicas. Las cé-

lulas sensoriales y simpáticas en los tubos de tejido producen neurotubulos en presencia del Factor del Crecimiento Nervioso cuando crecen las neuritas más aún la presencia de colchicina y vinblastina que rompen los neurotubulos pueden completamente inhibir el crecimiento de las neuritas. Estas posibilidades de la síntesis de túbulos específicamente aumenta en respuesta al Factor del Crecimiento Nervioso ha sido investigada, el uso de colchicina unida con una prueba para encontrar los neurotúbulos y reportar que han aumentado es relativamente una porción de la proteína total en presencia del Factor del Crecimiento Nervioso y en otros estudios con un punto de vista similar un aumento parecido no ha sido observado. Teniendo en cuenta que el Factor que la capacidad de la tubulina tiene para unirse a la colchicina disminuye rápidamente después de una variedad de condiciones se encuentra que una técnica aumentada en un 16 % de la proteína soluble total es proteína de neurotubulo y su valor se mantiene sin cambiar durante el crecimiento de las neuritas. Por lo tanto aparece que el Factor del Crecimiento Nervioso aumenta la sensibilidad de los neurotubulos --- existiendo previamente en subunidades y hay evidencias directas para apoyar esta interpretación. Se reporta que el Factor del Crecimiento Nervioso se une a la tubulina pero -

sus implicaciones de este descubrimiento todavía no han sido determinadas.

Como se nota en las secciones previas el Factor del Crecimiento Nervioso tiene un efecto definitivo en la actividad de las enzimas necesarias para la síntesis de la norepinefrina y tiroxina. Se ha demostrado que el Factor del Crecimiento Nervioso "in vivo" aumenta la especificidad de la tiroxina hidroxilasa y de la dopamina hidroxilasa. El mecanismo por el cual este factor produce esos efectos es desconocido.

La evidencia de los receptores de las células superficializadas al Factor del Crecimiento Nervioso ha sido citada previamente. La posibilidad de que el AMP cíclico sirve como segundo mensajero en esta acción para promover el crecimiento de las neuritas ha sido examinado. El Factor del Crecimiento Nervioso que no se encuentra elevado en el ácido AMP cíclico en los ganglios de los embriones estimula la adenil ciclasa en las suspensiones de las células rotas. Excitando los ganglios superiores de las ratas se reporta un aumento en el AMP cíclico con un máximo que ocurre a los 5 minutos adicionando el Factor del Crecimiento Nervioso. Sin embargo la respuesta máxima obtenida en un nivel relativamente alto de concentración 4 microgramos por mililitro y todavía una

pequeña actividad se detecta en cantidades tan pequeñas como 40 nanogramos por mililitro.

El ácido dibutil cíclico AMP puede hacer que crezcan - las neuritas de los embriones de pollo y de las ratas en -- sus ganglios sensoriales pero no en los embriones donde hay ganglios simpáticos. Frazier y sus colaboradores, han demostrado que el crecimiento inducido por el dibutilril cíclico- del AMP disminuye si el pH disminuye de 8 a 7 pero su manipulación no previene la extensión de las neuronas en res--- puesta al Factor del Crecimiento Nervioso. Finalmente, los efectos del AMP cíclico dibutilril son mimetizados por el bu tirato de sodio, sugiriendo que la acción para formar se de be exclusivamente a la acción de los radicales butílicos. - Estos resultados llevan al punto diferencial que la acción- del AMP cíclico y el Factor del Crecimiento Nervioso y la - respuesta de los ganglios simpáticos y sensoriales es proba- blemente no mediada a través del AMP cíclico.

Debe notarse que en un problema asociado a muchos de - estos estudios para ejercitar ganglios en donde no hay con- troles del Factor del Crecimiento Nervioso están desapare- ciendo. Es difícil tener resultados satisfactorios para --- observar aumento del metabolismo en ganglios tratados con - Factor del Crecimiento Nervioso debido a la estimulación o

para efectos secundarios en la viabilidad de las células ganglionares. Adicionalmente la contribución de las células no ganglionares a muchas de estas observaciones todavía no ha sido determinada.

### Resumen

El Factor del Crecimiento Nervioso aparentemente opera como un agente que permite la expresión total y diferenciación en sus células "blanco". Por el presente es muy poco - lo conocido acerca de su interacción con estas células. Su unión a células de la superficie específicas receptores y - terminaciones del órgano con un flujo retrógrado axonal en ambos elementos ha sido descubierta. Sin embargo, actualmen - te solo podemos examinar actos por los cuales el Factor del Crecimiento Nervioso estimula la síntesis enzimática, pro - mueve el desarrollo de las fibras y mantiene vivas las neu - ronas. Mayor investigación es necesaria para dilucidar es - tos detalles moleculares y funcionales de estos eventos.

Nuestro conocimiento actual del Factor del Crecimiento Nervioso sugiere en términos generales que su desarrollo se debe en las células neuronales en el momento del crecimien - to. Las células simpáticas y algunas poblaciones de neuro -

nas sensoriales respaldan al Factor del Crecimiento Nervioso tempranamente en su desarrollo pero únicamente después de tener su estado de diferenciación en las neuronas jóvenes posmitóticas. En este punto se vuelven dependientes del Factor del Crecimiento Nervioso para sobrevivir y bajo su influencia extienden sus neuritas y progresivamente van adquiriendo las marcas de neuronas maduras. Lesiones químicas y quirúrgicas de las neuritas y neuronas simpáticas inmaduras producen la muerte celular. La administración de Factor del Crecimiento Nervioso exógeno previene la célula que muere sugiriendo que su desarrollo tiene efecto por un factor-trófico que tal vez sea el mismo Factor del Crecimiento Nervioso y que es llevado a cabo del influjo retrógrado a la lesión. Aún con pruebas directas que el resultado letal de estas lesiones se debe a la interrupción del flujo retrógrado de sustancias tróficas la preservación de las neuronas por Factor del Crecimiento Nervioso es una prueba fuerte de su capacidad de soporte. Un número de reportes grandes ha sugerido que la admisión a estos otros detalles el Factor del Crecimiento Nervioso es quemostático; indirectamente hace el crecimiento neuronal para sus localizaciones teniendo altas concentraciones de este factor. Datos conclusivos para soportar esta sugestión todavía no se obtienen en la ac-



tualidad. En la terminación final del órgano ya establecida el flujo retrógrado permite cantidades relativamente grandes de Factor del Crecimiento Nervioso al ganglio. Las neuronas simpáticas llevan a esta respuesta para estimular la síntesis de tiroxina hidroxilasa una enzima con límites para producir la norepinefrina. Adicionalmente al Factor del Crecimiento Nervioso las hormonas y los influjos preganglionares incluyendo los corticoesteroides son necesarios para completar la maduración morfológica bioquímica de las neuronas simpáticas. El Factor del Crecimiento Nervioso parece ser necesario para mantener las neuronas simpáticas debido a su habilidad en las áreas terminales que se reflejan en los niveles de la síntesis de la norepinefrina por sus enzimas dentro de los ganglios. Adicionalmente, el desarrollo de neuronas simpáticas en los adultos y la regeneración de las lesiones de crecimiento también parecen ser reguladas por el Factor del Crecimiento Nervioso. Esta inferencia es una especulación en la actualidad y el flujo retrógrado del Factor del Crecimiento Nervioso para madurar neuronas sensoriales indican que su operación es a nivel de células igual que las anteriores. Por lo tanto, el Factor del Crecimiento Nervioso parece tener un papel clave en el crecimiento y --manutención de las respuestas neuronales.

## Factor del Crecimiento Nervioso y Enfermedades del Sistema Nervioso

Anteriormente hemos discutido el papel del Factor del Crecimiento Nervioso en la vida de las células "blanco". La habilidad del Factor del Crecimiento Nervioso para provocar el crecimiento de las neuritas de los ganglios del embrión de pollo "in vitro" en base a su ensayo. Un factor o varios se presentan en algunos tejidos humanos que pueden dar una respuesta similar al ensayo y cuya actividad en algunas circunstancias ha sido apropiada por la presencia de antisuero preparado con Factor del Crecimiento Nervioso de ratón. Por lo tanto hay evidencia que el ser humano produce Factor del Crecimiento Nervioso. De su actividad en la vida de las neuronas simpáticas y sensoriales y de los feocromocitomas, la asociación de Factor del Crecimiento Nervioso con un gran número de enfermedades de estos tejidos en el hombre ha sido examinadas. En esta última sección concluiremos y discutiremos de esta sustancia en varias enfermedades del Sistema Nervioso que ha sido descubierta. En particular el neuroblastoma es un foco de interés en la investigación del Factor del Crecimiento Nervioso porque teniendo la habilidad de producir diferenciación neuronal los investigadores-

han encontrado que el Factor del Crecimiento Nervioso tiene un lugar en la embriología del neuroblastoma por la especial atención en la tendencia de éste tumor para producir una regresión espontánea. La proliferación neuronal que se ve en los neurofibromas del tipo Von Recklinghausen's han dado lugar a un estudio de ese factor en esa enfermedad. El mantenimiento de estas neuronas simpáticas y sensoriales -- por dicho factor ha dado lugar a examinar su participación en las neuropatías sensoriales hereditarias que se caracterizan por un aumento y disminución del número de esa neurona. Como se indica no hay un factor definitivo en la relación entre el Factor del Crecimiento Nervioso y cualquier desorden del Sistema Nervioso. En esta parte el término Factor del Crecimiento Nervioso-actividades estimulantes se emplea para recordar lo que ha sido discutido como una sustancia curativa del Sistema Nervioso-Factor del Crecimiento Nervioso. Por ahora no se sabe el sitio de esta sustancia, su producción, sus propiedades fisicoquímicas, su desarrollo en el Sistema Central y su relación en el metabolismo.

### Neuroblastoma

Este es el tumor sólido extracraneal más común en la -

Infancia y en los niños. El 80 % de todos los casos ocurren a la edad de cinco años. Jaffe y Pochedly han hecho revisiones excelentes de esta materia aunque este tumor se piensa que viene del Sistema Simpático hay rasgos recientes indicando que el tumor puede venir de cualquier neuroblasto. El tumor consiste en neuroblastos neoplásicos de la cresta neuronal. Varios grados de maduración celular se presentan en el tumor. La presencia de neurofibromas y neuroblastomas en roquetas es característica, granos se presentan en el citoplasma de los neuroblastos y aumentan las cantidades de catecolaminas en plasma y orina. Un aspecto fascinante de la biología del neuroblastoma es su tendencia a tener una regresión espontánea por lo tanto en dicha regresión se ha reportado que es la mayor de todos los tumores humanos. La reacción puede ocurrir de tres citólisis con desaparición - necrosis hemorrágica con fibrocalcificación residual, diferenciación del neuroganglioma, un tumor benigno compuesto de células maduras a través de un estroma denso de neuritas y fibras de tejido conectivo. Bolande ha realizado 16 casos documentados de maduración de neuroblastoma para ganglioneuroma.

El neuroblastoma "in situ" representa un caso especial de regresión espontánea. Beckwith y Perrin han reportado po

cos neuroblastomas en glándulas adrenales en niños que han muerto por otras causas. La frecuencia de su hallazgo en sus series es de aproximadamente 250 y sube la ocurrencia clínica de neuroblastoma a un factor de 40. En esos focos los precursores actuales del neuroblastoma se manifiestan por una gran proporción por una regresión. Todas las reacciones "in situ" se detectan en niños menores de tres meses de edad. Estudios recientes del desarrollo de la glándula adrenal fetal, la naturaleza neoplásica actual de estos focos ha sido propuesta. Los autores notan que nódulos son una parte integral de la morfogénesis normal de este órgano y su presencia en el nacimiento y en la infancia representa una variación normal y no tumores microscópicos incipientes en estos casos.

Varias sugerencias se han hecho para indicar la regresión espontánea del neuroblastoma. Los factores inmunológicos pueden ser importantes. Los tumores en este caso pueden probar que tienen un buen pronóstico cuando son infiltrados con células plasmáticas y leucocitos. Los leucocitos de pacientes curados y de otras actividades pero sin controles, pueden inhibir el neuroblastoma cultivado en una colonia también bloqueando los factores que inhiben la actividad citotóxica del suero y pueden producir aumento del crecimien-

to tumoral que ha sido reportado. Los mecanismos tumorales pueden afectar el desarrollo del neuroblastoma y dar lugar a su regresión espontánea pero una documentación adecuada a esta hipótesis todavía se desconoce. Un estudio reciente ha indicado la especificidad de los linfocitos sobre los tumores y su citotoxicología. Estudios del neuroblastoma indican la demostrada capacidad de las neuritas para crecer y diferenciarse morfológicamente por lo tanto, estas células neoplásicas mantienen la habilidad de diferenciarse en un medio adecuado. Los neuroblastomas se pueden ver como un modelo importante que explora la posibilidad del cáncer a través de la diferenciación celular. Una mayor investigación se ha hecho para descubrir agentes que indican los neuroblastomas y determinan su sitio de acción para algunos de estos tumores. El Factor del Crecimiento Nervioso parece ser uno de esos agentes.

Reportes concernientes al desarrollo de la sustancia del Factor del Crecimiento Nervioso en los neuroblastomas se categoriza como sigue: aquellos que la prueban en el suero del paciente con neuroblastomas e indican una actividad contra el Factor de Crecimiento Nervioso, aquellos que examinan los tumores resecados con una actividad en el cual el Factor de Crecimiento Nervioso ha sido administrado al pa-

ciente con enfermedad avanzada y aquel en los cuales se examina el crecimiento del cultivo del tejido. La actividad se ha determinado mencionando previamente los ganglios intactos. Las neuritas crecen en respuesta con un desarrollo óptimo y una actividad que corresponde aproximadamente a 10 - ng. por mililitro de proteínas de Factor del Crecimiento Nervioso purificado en el estándar.

#### Factor del Crecimiento Nervioso y Neuroblastoma

Factor del Crecimiento Nervioso en el suero del neuroblastoma y tejido. Burdman y Golstein reportaron que los sueros de un adulto normal, de ocho niños normales y de pacientes con tumores epiteliales o mesenquimatosos no provocan una respuesta positiva. En contraste con ejemplos y sueros con seis niños con neuroblastoma fueron encontrados con un contenido equivalente de 1 a 10 unidades. El tipo de tratamiento que los pacientes reciben antes de tomar el suero no fue discontinuado a pesar que la muestra de variación estadística no se pudo observar. Suero contra Factor del Crecimiento Nervioso purificado, preparado por el método de Cohen tuvo reacción cruzada, debilitada con el Factor del Crecimiento Nervioso y puede prevenir el crecimiento de las

fibras. Extractos de diferentes tejidos humanos fueron activados, extractos de neuroblastomas tenían bajos niveles de este factor. El antisuero no inhibe el crecimiento del neuroblastoma, los tubos de tejidos homogenados crudos del neuroblastoma, preparados por otros, dan una respuesta negativa. Se indicó en una comunicación pequeña, pero sin presentación de datos experimentados, que la actividad biológica se puede detectar en las muestras de muchos niños con tumores neuronales. La naturaleza precisa del tumor no se indica si esta actividad desaparece con la protección de la masa. La actividad no se detectó con los sueros, con todo y el tumor, Winick y Greenberg reportaron que en una difusión doble de agar, hay una línea de identidad que se detecta entre el suero del niño con un tumor inespecífico de la cresta neural y del Factor del Crecimiento Nervioso del ratón - preparado con el método de Cohen. Otros antígenos del Factor del Crecimiento Nervioso impuro pueden tener resultados con una línea de precipitación visible.

Estudios recientes han fallado para indicar diferencias entre el Factor del Crecimiento Nervioso en pacientes con neuroblastomas y sus controles. Bill ha reportado que los factores de 16 de 78 niños dan un resultado negativo y que las subsecuentes 62 muestras registran un rango de 1 a



12 unidades con una muestra de 3.8. Múltiples ejemplos obtenidos de 13 pacientes indican respuestas no apreciables diferentes de otros controles. Las muestras que se han tomado después de la operación y durante la quimioterapia con ciclo tomida vincitcina. Ningún humano ni sueros de ratones interfieren con la actividad biológica de una sepa purificada 7A de Factor del Crecimiento Nervioso de los ratones. Ningún resultado se ha obtenido bloqueando el Factor de Crecimiento Nervioso por un suero. Estudios de inmunoelectroforesis hechos con un antisuero contra el 7S de Factor del Crecimiento Nervioso complejo indican que no hay reactivación en el material del suero humano. Sin embargo, los datos de bajos niveles de actividad del Factor de Crecimiento Nervioso en este último pueden prevenir en su determinación segura. También es posible de que no haya especificidad de anticuerpos de la unidad beta de Factor del Crecimiento Nervioso en el antisuero. Los mas grandes controles de series se han presentado por Waghe y colaboradores, que dictaminaron los sueros de 621 controles incluyendo infantes, niños, estudiantes adultos y mujeres embarazadas. Esos resultados no revelaron diferencias de controles y siete pacientes con neuroblastoma.

## Administración de Factor del Crecimiento Nervioso en pacientes con neuroblastomas

Esperando que la administración del Factor del Crecimiento Nervioso puede acelerar la maduración y hasta ahora retardar el crecimiento del tumor, Kumar y colaboradores dieron diez inyecciones de 10-mg de 7S de Factor del Crecimiento Nervioso intramuscular diario durante 7 a 10 días en 3 niños con la enfermedad diseminada. Durante el curso del tratamiento hubo un aumento en la presión arterial, una sudoración profunda y muchos dolores de cabeza desarrollándose inmediatamente después de la cuarta y subsecuentes inyecciones. Aunque una elevación marcada de la respuesta fue detectada en el suero durante el tratamiento, no hubo evidencia clínica de mejoramiento. Estos investigadores indican que la inhabilidad para influenciar el curso clínico se debe a alteraciones en las células neoplásicas que no responden al Factor del Crecimiento Nervioso. En apoyo a esta tesis encontramos que no hay citotoxicidad de anti-Factor de Crecimiento Nervioso en los neuroblastomas en tejidos y estos fueron imposibles de tener antifuoreseína contra ellos.

## Estudios de neuroblastomas en tejidos de cultivo

Estudios del desarrollo del tumor en condiciones de cultivo indican que el neuroblastoma tiene un factor intrínseco de capacidad para maduración. Murray y Stout observaron que los axomas comenzaron a crecer después de 24 horas después de ser cultivados; ésta observación se usa como diagnóstico por Goldstein y Pinkel y mantiene crecimiento de neuroblastomas de pacientes de cultivo durante meses. Durante el tiempo que ellos observaron el crecimiento de los procesos axonales de los neuroblastomas y su maduración en células ganglionares. Como el cultivo continuó, el crecimiento de los ganglios aumentó en número y en actividad mitótica. Maduración espontánea ocurrió sin agregar Factor de Crecimiento Nervioso, pero el complejo usado, con una adicional de Factor de Crecimiento Nervioso, una substancia-  
contra ello. Del neuroblastoma cultivado indican que se forma una línea del neuroblastoma en los ratones. A pesar de la respuesta del factor la diferencia morfológica que ocurre en el cultivo es similar a la que se ve durante el desarrollo y se establece firmemente en el neuroblastoma y retiene la habilidad para diferenciarse.

Estos cultivos de neuroblastoma humano son respuesta

al Factor del Crecimiento Nervioso. La dependencia 7S de -- Factor del Crecimiento Nervioso de diferenciación de neuroblastoma en una niña de cuatro años se ha reportado. La reproducción de esta respuesta no se ha detallado. Es posible que la maduración de las células se presenta como una cosa inicial y se acompaña por crecimiento de las neuritas. En el neuroblastoma humano indica células que se examinan para respuesta del Factor del Crecimiento Nervioso y su crecimiento de neuritas que se hace adicionando una unidad de -- Factor de Crecimiento Nervioso de ratón y no se afecta el crecimiento; la clono IMR-32 responde al Factor del Crecimiento Nervioso del ratón con diferenciación morfológica.

Aunque es todavía prematuro indicar la patogénesis del neuroblastoma, que sea la misma en el ratón y en el humano, el estudio del neuroblastoma murino ha producido una gran cantidad de información. Las células tumulares inducen las neuritas en una variedad de estímulos, se expresan enzimas neuronales y producen neurotransmisores, que presentan acción potencial en respuesta a la acetolina. Recientemente, se ha indicado que el neuroblastoma de la variedad glioma-híbrida tiene sinapsis funcional con las células musculares. Prasad ha revisado el control morfológico y la diferenciación bioquímica del neuroblastoma "in vitro", especial-

mente para el AMP cíclico y su potencial valor terapéutico. Estudios de tejidos cultivados de neuroblastoma indican que hay testimonio de heterogeneidad de tumores en sus células. Así que el factor del neuroblastoma en el ratón puede ser adrenérgico, colinérgico o serotoninérgico. Células colinérgicas se han demostrado en el neuroblastoma en el humano y en el ganglioneuroma.

Aparte de un único reporte de la cantidad aumentada en actividad acetilcolinesterasa en el cultivo de neuroblastoma de conejo, no hay otros estudios que documenten sus cambios bioquímicos morfológicos en estos tumores y sus clones en relación al Factor del Crecimiento Nervioso. Revoltella y sus colaboradores, reportaron unión saturable de iodo 125 Factor del Crecimiento Nervioso a las células C1300, el factor con una disociación constante de orden de  $10^{-7}$  mole. La importancia biológica de esta afinidad baja es desconocida al presente y no se sabe los sitios en que ocurre la concentración de Factor del Crecimiento Nervioso en posibilidades biológicas.

Los cambios morfológicos y bioquímicos heterogéneos -- del neuroblastoma sugieren que hay una heterogeneidad similar existente entre sus respuestas al Factor del Crecimiento Nervioso y su antisuero.

## Factor del Crecimiento Nervioso, Discusión

Unicamente hemos examinado la influencia del Factor de Crecimiento Nervioso en la biología del neuroblastoma. Ningún dato convincente prueba o desaprueba que esto afecta el desarrollo o regresión espontánea del tumor y sus alteraciones en el suero o en el tejido que ocurre con pacientes con neuroblastomas. La habilidad del Factor de Crecimiento Nervioso para producir aumento morfológico diferenciado en algunos humanos "in vitro", sugiere que en casos selectos también produce cambios "in vivo". La falla en la mejoría clínica después de la administración del Factor de Crecimiento Nervioso por Kumar y colaboradores, indica la importancia de caracterizar inicialmente tumores por la presencia de receptores de Factor de Crecimiento Nervioso y por respuesta "in vitro" de Factor de Crecimiento Nervioso. Estudios futuros de la respuesta del neuroblastoma humano al Factor de Crecimiento Nervioso deben examinarse, caracterizando la morfología y diferenciación bioquímica. Unicamente de esta manera puede uno empezar a apreciar la importancia del Factor de Crecimiento Nervioso en la biología y respuesta individual de tumores y su útil potencial como agente terapéutico.

## Feocromocitoma

Generalmente este tumor se compone de células de la cresta neurológica y dá lugar al desarrollo de la médula adrenal o menos frecuentemente, al tejido de cromafin a lo largo de la cadena simpática. Los síntomas que ocurren son: hipertención paroxismica, dolor de cabeza, taquicardia postural, problemas de visión, transpiración profusa y pérdida de peso. Proporciones variables de Epinefrina y Neuroepinefrina se liberan por el tumor.

Green y Tschler comunicaron que el cromocitoma adrenal clon P 12 responde al Factor de Crecimiento Nervioso. La presencia de este factor (50 nanogramos por mililitro) dá lugar a la cesación de la división celular y la extensión de las neuronas procedentes del 80 % del cultivo de células. Este clono produce dopamina-norepinefrina, pero no parece sintetizar la epinefrina aún después de la adición de dexametazona a un potente glucocorticoide sintético. Tischler y colaboradores, han reportado el crecimiento del proceso neurológico desde cinco feocromocitomas humanos separados en cultivo. El Factor de Crecimiento Nervioso ha demostrado el aumento del número de células en ésta apología. La habilidad de estas células para producir tales objetivos es

interesante porque la célula adrenal no se forma "in vivo" y no se conoce respuesta al Factor de Crecimiento Nervioso en cultivo. Sin embargo, en algunos feocromocitomas humanos se han encontrado células ganglionares maduras en focos de ganglioneuromas, además de feocromocitomas y ésta célula -- responde al proceso de formación en los cultivos de huma-- nos. Estudios posteriores "in vitro" con respuesta al feo-- cromocitoma son deseables.

### Neurofibromatosis (Enfermedad de Von Recklinghausen)

Es una enfermedad de complejidad considerable en la -- cual los cambios patológicos son focos de hiperplasia y neoplasia en los tejidos de soporte del sistema nervioso entero. El desorden se denomina en una relación de 1 en 2000 a 3000 individuos. En el cráneo, médula y nervios periféricos los elementos envueltos con el tumor. Todos los tejidos tie-- nen desarrollo neoplásico y adicionalmente en el sistema ner-- vioso central hay ciertas lesiones hiperplásicas y hemato-- matosas.

Los nervios periféricos usualmente se llaman neurofi-- bromas. Ocurren a lo largo de las terminaciones periféricas y los nervios autonómicos de los ganglios simpáticos. Pue--



den ocurrir en zonas plexiformes de los nervios y en fibras, algunas pueden salir con una proliferación neurítica, como se ve en el neurofibroma. Las células proliferativas de los neurofibromas se cree que son células de Schwann de los fibroblastos perineurales, y que de los tumores colágenos, tiene colágena y reticulina. Los nervios craneal y espinal usualmente se multiplican y aparecen en las terminaciones nerviosas, los ocho nervios craneales constantemente aparecen y no hay tumores usualmente bilaterales. Aunque son los más raros tumores de los nervios, los meningiomas, epedimomas y algunos tipos de gliomas, también se pueden ver. El crecimiento variable del tumor y la proliferación neurítica y no neurítica y de sus asociaciones con feocromocitoma y ganglioneuroma, sugieren que hay Factor del Crecimiento Nervioso humano en esta enfermedad. Schenkein y colaboradores encontraron que en las muestras de los sueros de 24 pacientes con neurofibromatosis, estadísticamente tienen mayor respuesta a las fibras que los ganglios de los embriones de pollo "in vitro" y los otros controles. Los autores usan dos divisiones de suero en el bioensayo, Tischler apuntualizado que debido a la respuesta del bioensayo del crecimiento de las fibras la actual concentración del Factor del Crecimiento Nervioso tiene menos cantidad que los -

sujetos normales. No se ha hecho ningún intento para bloquear la respuesta al bioensayo con antisuero para el Factor del Crecimiento Nervioso.

Utilizando radioinmunoanálisis con Factor de Crecimiento Nervioso marcado y antisuero, Siggers y colaboradores y el mismo Siggers sólo, no han podido demostrar que el suero en los pacientes con neurofibromatosis contengan diferentes niveles de especies moleculares con reacción cruzada antigénica. Siggers y colaboradores, también han reportado que -- tres pacientes con autosomas dominantes bilaterales y neuromas del acústico, sufren de una forma central de neurofibromatosis y así como dos de seis personas que genéticamente tienen riesgo a este elemento, tienen niveles elevados de este Factor de Crecimiento Nervioso en el radioinmunoanálisis. Se sugiere que la forma central de la enfermedad dá -- una elevación de este factor inmunológicamente similar. --- Schenkein y Siggers han empleado otro tipo de ensayo para caracterizar la respuesta últimamente detectada.

La proliferación de neuronas en las regiones de los -- neurofibromatosis sugiere que esta enfermedad puede tener -- alteraciones. Los datos hasta ahora presentes para la aberración del Factor de Crecimiento Nervioso son incompletos. Estudios posteriores beneficiarán la capacidad de difusidad

si el uso de estas tres técnicas de ensayo que se discuten en una sección subsecuente son importantes en la lesión de la neurofibromatosis reflejando una sobreproducción local de las alteraciones sistémicas. En este caso el ensayo de los materiales de biopsia pueden ser altamente informativos.

### Neuropatías sensoriales hereditarias

Dentro del grupo de neuropatías hereditarias con atrofia neuronal y degeneración, se encuentran afectando neuronas periféricas, las que más parecen ofrecer frutos en su correlación con el Factor de Crecimiento Nervioso. Las neuropatías hereditarias sensoriales y la degeneración espino-cerebral se caracterizan por los siguientes factores comunes: son inherentes, las neuronas sensoriales periféricas están dañadas, daño neuronal es una degeneración sistémica y la población de neuronas sufre diversos cambios de modalidades sensoriales, hay una pérdida progresiva de las fibras neuronales por atrofia del axón y degeneración. En la clasificación de estas degeneraciones y sus grupos se distinguen una serie de datos inherentes, historia natural y población neuronal. Una revisión de estas enfermedades recientemente-

ha sido publicada y sus principales factores se resumen a continuación.

Tipo I, este tipo de enfermedad se caracteriza por ser inherente dominante, inicio insidioso de los síntomas durante la segunda década y pérdida de la disociación sensorial más marcada en extremidades distales, con dificultad para percibir el dolor y las sensaciones térmicas y la presión. Las biopsias de nervios indican disminución marcada de las fibras amielínicas con menos alteración en las fibras mielínicas pequeñas y grandes.

El tipo II de estas enfermedades son recesivas autosómicas inherentes, el inicio de los síntomas aparece en la infancia o en la niñez, hay una pérdida sensorial que afecta todas las modalidades, se marca más en las cuatro extremidades. Los cambios patológicos se caracterizan por espasticidad y cambios en los receptores de la piel con cierta ausencia de fibras mielínicas de los nervios cutáneos en las zonas distales con preservación del número de fibras no mielínicas.

El tipo III de estas enfermedades es mejor conocido como disautonomía familiar de síndrome de Riley-Day. Es una enfermedad recesiva autosómica. El 90 % de los casos reportados ocurren en los niños judíos. Se caracteriza por la --

disminución de la difusión de las neuronas autónomas con pérdida sensorial y motora y en algunos casos también neuronas del sistema nervioso central. Las recientes descripciones de los síntomas, signos y alteraciones en la fisiología descubren alteraciones en los metabolismos de las catecolaminas la variabilidad de los resultados patológicos en las familias hacen difícil definir la naturaleza y extensión de los cambios. Cohen y Solomon, y Brown y colaboradores encontraron degeneración de las fibras mielínicas en el sistema reticular del cerebro y en el último grupo de estudios descubren cambios similares en los largos conductos de la espina dorsal. Una disminución del número de neuronas en las -- simpático cervicales y torácicos, nervios de gaser y ganglios espinales han sido reportados por Pearson. Una biopsia de nervios examinada por Aguayo indicó que hay una disminución grande del número de fibras no mielínicas y pequeñas fibras mielínicas. Pearson y colaboradores no han podido detectar los contenidos de norepinefrina y biopsia similares.

Una serie de trabajos tienen en común la indicación de insensibilidad al dolor, la falta de hidrosis y una disminución del retardo mental pequeño. Estos datos dan al paciente de este grupo diferencias de las neuropatías heredi-

tarias. Han sido clasificados bajo los tipos IV. Los exámenes post-muerte de un caso indican que hay ausencia de las neuronas pequeñas y de los ganglios espinales, disminución de las raíces dorsales y ausencia de los tractos de Lissauer's.

La degeneración espinocelular clasificada por Groenfield, acompaña una serie de signos degenerativos que ocurren tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. De especial importancia para esta discusión son los bien estudiados casos de sensibilidad sensorial y motoneuronas. Desde el punto de vista de Dyck y Ohta, la biopsia de la columna posterior y la pérdida de fibras nerviosas dan una atrofia neuronal que afecta las fibras distales y proximales de las neuronas sensoriales. La autopsia y las biopsias han indicado una buena correlación entre la disminución de las fibras mielínicas de nervios periféricos y en las condiciones del paciente.

El papel que en estas enfermedades hace el factor del sistema nervioso ha sido examinado por Siggers en sueros de pacientes con analgesia congénita usando radioinmunoanálisis y bioensayo, y no encontró diferencia de ellos con los controles. Por lo tanto no es claro de la naturaleza de las enfermedades hereditarias de estos pacientes. Las biopsias-

de los nervios y la evaluación de los tejidos dan el diagnóstico del tipo I. Los ejemplos en los sueros de cuatro pacientes de tipo IV se encontraron también niveles normales por radioinmunoanálisis, con alguna disminución por la actividad biológica.

Muchos pacientes del tipo III de estas enfermedades se estudiaron con los tres tipos de ensayo descrito para el Factor de Crecimiento Nervioso-bioensayo, radioreceptores y radioinmunoanálisis. El ensayo por radioreceptores se basa en la competencia del Factor del Crecimiento Nervioso del ratón para sitios de unión en la fracción microsómica del ganglio simpático en el conejo. El bioensayo y el radioreceptor fueron concordantes; los sueros encontraron niveles de Factor de Crecimiento Nervioso no diferentes de los controles. Paradójicamente, el Factor de Crecimiento Nervioso estimulado por radioinmunoanálisis utilizando el factor beta y el anti-beta fue tres veces más alto en pacientes con disautonomía que los controles. Se debe hacer notar que los niveles del Factor de Crecimiento Nervioso de los controles estimados por tres diferentes métodos dan diferencias de dos órdenes de magnitud cuando se expresan en nanogramos equivalentes al Factor de Crecimiento Nervioso en el ratón por mililitro (bioensayo, 2.2, radioinmunoanálisis).

sis, 32 y unión de 80 a 120). También, en esto y en los estudios anteriores, los sueros de los grupos controles presentan actividad similar en los límites de sensibilidad del bioensayo de los ganglios. Dos posibilidades se sugieren para explicar la presencia de alteración de la disautonomía con los antígenos similar y proporcionalmente diferentes a los controles. Una mutante en la estructura genética de Factor de Crecimiento Nervioso para una función no adecuada, con un resultado de aumento de la compensación para producirse factor alterado. Alternativamente, un defecto en la manera de procesar el Factor de Crecimiento Nervioso por biosíntesis puede llegar a causar acumulación de un producto inactivo que inmunológicamente produce reacción en el precursor. Hay otras posibilidades, tal vez el suero de los pacientes con disautonomía contengan componentes que hacen unir al Factor de Crecimiento Nervioso. Debido a la competencia del factor unido a su antisuero produce elevaciones falsas de inmunoanálisis. Estas posibilidades son la falsa elevación de radioinmunoanálisis por la presencia de niveles altos en suero de los disautonómicos que había una disminución en la modificación de la hormona marcada y preveniría su unión al anticuerpo. La existencia de estos componentes se explican en una sección subsecuente.



La clasificación de las neuropatías sensoriales hereditarias acompañada a los desordenes clónicos que indican sensación alterada prototáctica y epicrítica, han sido determinadas con modalidades sensoriales y se transmiten por las neuronas primarias que responden en la vida embrionica al Factor de Crecimiento Nervioso. Por lo tanto, sí es creíble que hay una correlación con estas neuropatías. Puede ser que estudios futuros de esas enfermedades demuestren los defectos de nivel de los receptores a Factor de Crecimiento Nervioso.

#### Enfermedad de Hipotensión Idiopática (Síndrome de Shy-Drager)

Esta es una enfermedad adquirida, progresiva, degenerativa, que actúa sobre el sistema nervioso autónomo y que empieza en la edad media. Sus alteraciones fisiológicas y anomalías metabólicas se asocian con otras degeneraciones del sistema nervioso central que recientemente ha sido revisada. La principal alteración clínica se debe a la falla de los receptores adrenérgicos y los cambios degenerativos en neuronas preganglionares y ganglios autónomos. Los cambios degenerativos en las células preganglionares y en

la columna intermedia lateral de la espina dorsal se acompaña con múltiples signos de degeneración en varias partes del sistema nervioso central y causan degeneración postganglionar.

Los experimentos hasta ahora sugieren que el Factor de Crecimiento Nervioso no tiene ningún valor terapéutico en esta enfermedad. Los valores normales de requerimiento en presencia del Factor de Crecimiento Nervioso preganglionar no puede ser reemplazados por éste. Aunque el tratamiento en animales neonatales con el Factor de Crecimiento Nervioso aumenta la inervación preganglionar en virtud de aumentar el crecimiento y diferenciación de células preganglionares, este efecto no ha sido descrito en animales adultos.

### Discusión

Como puede ser visto claramente la literatura presente hasta ahora, dá datos conflictivos del efecto del Factor de Crecimiento Nervioso en las enfermedades neuronales. No creemos por lo pronto que haya datos suficientes para refutar o confirmar la presencia de cantidades alterativas cuantitativas o cualitativas de este factor en enfermedades neuronales. Los datos conflictivos por naturaleza se deben a una

falta de sensibilidad y reproducibilidad de alguno de los métodos de ensayo empleados, y no tenemos controles apropiados. Adicionalmente, todos los ensayos que se encuentran en el Factor de Crecimiento Nervioso están con el uso de estos materiales de especies distintas a la del hombre. El bioensayo emplea embriones de gallina y los radioreceptores usan fracciones de membrana de conejo. El Factor de Crecimiento Nervioso del ratón y su antígeno con anticuerpos se usa y se estandariza en todos los ensayos. Especies diferentes para esta fuente de materiales puede comprometer nuestra habilidad para obtener datos creíbles. Por ejemplo, la afinidad relativa del Factor de Crecimiento Nervioso del humano y la del ratón para los receptores o sitios inmunoquímicos pueden diferir. El cuce del problema se refiere a la falta de fuente en el humano por que no existe. El factor del humano debe ser purificado y estandarizado para obtener ensayos -- adecuados. La determinación del Factor de Crecimiento Nervioso en el suero, urina y biopsia requieren mucho trabajo de estadarizaciones de ellos. Solo así tendremos suficiente interpretación de los datos. Un número de laboratorios está trabajando para aislar y caracterizar el Factor de Crecimiento Nervioso del humano.

La utilización en pacientes y controles para interpre-

taciones de todos los factores de crecimiento es difícil. Como ha sido dicho por Levi-Montalcini, el estudio en las poblaciones deben merecer consideraciones como sexo, edad, raza con otros sistemas y enfermedades neurológicas que requieren la interpretación de resultados. Los datos hasta -- ahora que se conocen sugieren que los niveles del Factor de Crecimiento Nervioso y sus reacciones cruzadas pueden dar - mucha fluctuación.

Actualmente, tres técnicas se usan para el Factor de - Crecimiento Nervioso en suero, orina y biopsia: bioensayo, - el ensayo por radioreceptor y radioinmunoensayo. De 10 a -- 100 a aumentado la sensibilidad y la cuantificación que se puede tener con el bioensayo de una simple célula para el - Factor de Crecimiento Nervioso, sugiriendo que este ensayo - puede reemplazar el clásico de todos los ganglios. Cada en - sayo debe ser completado en una serie de diluciones, y cuan - do es necesaria con controles que incluye el uso de Factor - de Crecimiento Nervioso, actualmente ya es utilizable el -- del ratón. La especificidad del crecimiento de las fibras, - también debe ser visualizado por cuantificación utilizando - diluciones de antisuero apropiado.

Los ensayos por radioreceptores, dan técnica relativa - mente nueva para medir el Factor de Crecimiento Nervioso. -

El uso de técnicas similares en estudio de enfermedades humanas, evidentemente ha sido empleadas por Kahn y colaboradores. Con otros radioreceptores de otras hormonas, la aplicación clínica de este tipo de ensayo, debe satisfacer los criterios que se discuten en la sección de estudios de receptores de Factor de Crecimiento Nervioso, líneas atrás.

El radioinmunoanálisis es otro método para medir el Factor de Crecimiento Nervioso. La disponibilidad de anticuerpos para factor contra el hombre aumentará enormemente el valor de esta técnica. A través de éste ensayo, ahora es posible que haya menos sensibilidad en el bioensayo para una simple célula que el ensayo por radioreceptores, pero dará un valor adjunto a ellos. Adicionalmente, se detectan biológicamente sustancias inactivas, pero antigénicamente similares, que pueden servir como marcadores de ciertos estados patológicos.

Pegando componentes del Factor de Crecimiento Nervioso en el suero humano y en la orina humana, y en el suero del ratón, se ha podido detectar de acuerdo a Thoenen. Es posible también que estos ensayos contengan muestras de material que se cruzan con radioinmunoanálisis y radioreceptores. Finalmente, la presencia de factores en el suero del tejido, modifica la degradación del Factor de Crecimiento -

Nervioso. Estas especies pueden influir en los datos existentes y pueden ser importantes marcadores para ciertos estados patológicos. Por lo tanto, la muestra de pacientes debe ser chequeada rutinariamente en todos sus componentes y -- los resultados de la determinación del Factor de Crecimiento Nervioso humano en un solo ensayo, debe ser analizado en relación a los resultados obtenidos por los otros dos.

Una consideración de los datos que indican el papel del Factor de Crecimiento Nervioso y Factor humano en distintas enfermedades del sistema nervioso, llega a una serie de conclusiones. Por lo pronto no hay una evidencia final de que en estas enfermedades esté involucrado el Factor de Crecimiento Nervioso del humano. Los datos existentes hasta ahora no soportan el peso de que el Factor del Crecimiento-antisuero fuese útil para su tratamiento. Estudios posteriores beneficiarán la posibilidad de que el Factor de Crecimiento Nervioso y una técnica para detectarlo de manera sensitiva, dé mas luz sobre este campo. Aún más estos estudios indican que sí hay un papel del Factor de Crecimiento Ner--vioso del humano en la patogénesis de algunas de estas en--fermedades y sugiere caminos por el cual el Factor de Creci--miento Nervioso del humano y su antisuero puedan ser utili--zados terapéuticamente.

## BIBLIOGRAFIA

- Abell M R, Hart W R, Olson JR: Tumors of the peripheral nervous system Hum Pathol 1:503-551, 1970
- Aguayo AJ, Nair CPV, Bray GM: Peripheral nerve abnormalities in the Riley-Day syndrome: findings in a sural nerve biopsy. Arch Neurol 24:106-116, 1971
- Amano T, Richelson E, Nirenberg M: Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. Proc Natl Acad Sci USA 69:258-263, 1972
- Angeletti PU, Gandini-Attardi D, Toschi G, et al: Metabolic aspects of the effect of nerve growth factor on sympathetic and sensory ganglia: protein and ribonucleic acid synthesis. Biochim Biophys Acta 95:111-120, 1965.
- Angeletti PU, Levi-Montalcini R, Caramia F: Analysis of the effects of the antiserum to the growth factor in adult mice. Brain Res 27:343-355, 1971
- Angeletti PU, Levi-Montalcini R, Caramia F: Ultrastructural changes in sympathetic neurons of newborn and adult mice treated with nerve growth factor. J Ultrastruct Res 36:24-36, 1971
- Angeletti PU, Levi-Montalcini R, Kettler R, et al: Comparative studies on the nerve growth factor on sympathetic

- ganglia and adrenal medulla in newborn rats. Brain Res 44:197-206, 1972
- Angeletti PU, Levi-Montalcini R: Sympathetic nerve cell destruction in newborn mammals by 6-hydroxydopamine. Proc Natl Acad Sci USA 65:114-121, 1970
- Angeletti PU, Liuzzi A, Levi-Montalcini R: Stimulation of lipid biosynthesis in sympathetic and sensory ganglia by a specific nerve growth factor. Biochim Biophys Acta 84:778-781, 1964
- Angeletti PU, Liuzzi A, Levi-Montalcini R, et al: Effect of a nerve growth factor on glucose metabolism by sympathetic and sensory nerve cell. Biochim Biophys Acta 90:445-450, 1964
- Angeletti RH, Bradshaw RA: Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. Proc Natl Acad Sci USA 68:2417-2420, 1971
- Angeletti RH, Hermodson MA, Bradshaw RA, Amino acid sequences of mouse 2.58 nerve growth factor. II. Isolation and characterization of the thermolytic and peptic and the complete covalent structure. Biochemistry 12:100-115, 1973
- Angeletti RH, Hermodson MA, Bradshaw RA: Amino acid sequences of mouse 2.58 nerve growth factor. I. Isolation --



- and characterization of the soluble tryptic and chymotryptic peptides. *Biochemistry* 12:90-100, 1973
- Angeletti RH, Immunological relatedness of nerve growth factors. *Brain Res* 25:424-427, 1971
- Angeletti RH, Nerve growth factor (NGF) from snake venom -- and mouse submaxillary gland: interaction with serum -- proteins. *Brain Res* 12:234-237, 1969
- Appenzeller O: *The Autonomic Nervous System: An introduction to basic and clinical concepts*. Second edition. New York, American Elsevier, 1976
- Argos P: Prediction of the secondary structure of mouse nerve growth factor and its comparison with insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 70:805-811, 1976
- Bailey GS, Banks Bec, Carstairs JR, et al: Immunological -- properties of nerve growth factors. *Biochim Biophys -- Acta* 437:259-263, 1976
- Bailey GS, Banks Bec, Pearce FL, et al A comparative study of nerve growth factors from snake venoms. *Comp Bio--chem Physiol* 51B:429-438, 1975
- Banerjee SP, Cuatrecasas P, Snyder SH: Nerve growth factor-receptor binding: influence of ions, enzymes, and protein reagents. *J Biol Chem* 250:1427-1433, 1975
- Banerjee SP, Snyder S, Cuatrecasas P, et al: Binding of ner

- ve growth factor receptor in sympathetic ganglia. Proc Natl Acad Sci USA 70:2519-2523, 1973
- Banks BEC, Charlwood KA, Edwards DC, et al: Effects of nerve growth factors from mouse salivary glands and venom on the sympathetic ganglia of neonatal and developing mice. J Physiol (Lond) 247:286-298, 1975
- Bansal SC, Hargreaves R, Syögren HO: Facilitation of polyoma tumor growth in rats blocking sera and tumor eluate In J Cancer 9:97-108, 1972
- Banthorpe DV, Pearce FL, Vernon CA: Effects of nerve growth factor from the venom of Vipera russelli on dispersed-sensory ganglion cell from embryonic chick. J Embryol-exp Morphol 31:151-167, 1974
- Beckwith JB, Perrin EV: In situ neuroblastoma: contribution to the natural history of neural crest tumors. Am J -- Pthol 43:1089-1104, 1963
- Berger EA, Shooter EM: Beta Nerve growth factor synthesis - in mouse submaxilar glands Fed Proc 35:1684, 1976
- Berger EZ Shooter EM: Nerve growth factor: studies on the - localization regulation and mechanism of its biosynthe sis, The 35th Symposium of the Society for Developmental Biology Molecular control of proliferation and differentiation. Edited by J Papaconstantinou, WJ Rutter

New York, Academic Press (in press)

Idem: The biosynthesis and processing of pro-beta-NGF, a -- biosynthetic precursor to beta-nerve growth factor. -- Proc Natl Acad Sci USA 74:3647-3651, 1977

Bill AH: Immune aspects of neuroblastoma: current information. Am J Surg 122:142-147, 1971

Bill AH, Seibert ES, Beckwith JB, et al: Nerve growth factor and nerve-growth-stimulating activity in sera from normal and neuroblastoma patients, J Natl Cancer Inst. 43:1221-1230, 1969

Bill AH: The implications of immune reactions to neuroblastoma. Surgery 66:415-418, 1969

Bjerre B, Björklund A, Edwards DC: Axonal regeneration of peripheral adrenergic neurons effects of antiserum to nerve growth factor in mouse. Cell Tissue Res 148:441-476, 1974

Bjerre B Björklund A, Mobley W: A stimulatory effect by nerve growth factor on the regrowth of adrenergic nerve fibers in the mouse peripheral tissues after chemical-sympathectomy with 6-hydroxydopamine Z Zellforsch Mikrosk Anat 146:15-43, 1973

Bjerre B, Björklund A, Mobley W, et al: Short-and long-term effects of nerve growth factor on the sympathetic ner-

- vous system in the adult mouse. Brain Res 94:263-277, 1975
- Bjerre B, Bjorklund A, Stenevi U: Stimulation of growth of new axonal sprouts from lesioned monoamine neurones in adult rat brain by nerve growth factor. Brain Res 60: 161-176, 1973
- Bjerre B, Bjorklund A, Stenevi U: Inhibition of the regenerative growth of central noradrenergic neurons by intracerebrally administered anti-NGF serum. Brain Res 74:1-18, 1974
- Bjerre B, Rosengren E: Effects of nerve growth factor and its antiserum on short adrenergic neurons in the male mouse. Cell Tissue Res 150:299-322, 1974
- Bjerre B, L Edwards DC: A study of the de- and regenerative changes in the sympathetic nervous system of the adult mouse after treatment with the antiserum to nerve growth factor. Brain Res 92:257-278, 1975
- Bjorklund A, Stenevi U: Growth of central catecholamine neurons into smooth muscle grafts in the rat mesencephalon. Brain Res 31:120, 1971
- Bjorklund A Bjerre B, Wiklund L: NGF in maintenance and regeneration of adrenergic axons. Proceedings of the Sixth Congress of Pharmacology. Vol 2, Edited by L

- Ahtee. Helsinki Finnish Pharmacological Society, 1975, pp 259-274
- Black IB, Hendry IA, Iversen LL: Effects of surgical decentralization and nerve growth factor on the maturation of adrenergic neurons in a mouse sympathetic ganglion. J Neurochem 19:1367-1377, 1972
- Black IB, Petito CK Catecholamine enzymes in the degenerative neurological disease idiopathic hypotension. Science 192:910-912, 1976
- Bocchini V, Angeletti PU: The nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular-weight protein. Proc Natl Acad Sci USA 64:787-794, 1969
- Bolande RP: Benignity of neonatal tumors and concept of cancer repression in early life. Am J Dis Child 122:12-14 1971
- Bolande R P: The neurocristopathies: a unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. Hum Pathol 5:409-429, 1974
- Brown WJ, Beauchemin JA, Linde LM: A neuropathological study of familial dysautonomia (Riley-Day syndrome) in siblings. J Neurol Neurosurg Psychiatry 27:131-139, 1964
- Brown WJ, Podosin R: A syndrome of the neural crest. Aech. Neurol 15:294-301, 1966

- Bueker ED: Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response the lumbosacral nervous system. Anat Rec 102:369-390, 1948
- Burdman JA, Goldstein MN: Long-term tissue culture of neuroblastoma. III. In vitro studies of a nerve growth-stimulating factor in sera of children with neuroblastoma J Natl Cancer Inst 33:123-133. 1964
- Burnham P, Raiborn C, Varon S: Replacement of nerve-growth-factor by ganglionic non-neuronal cells for the survival in vitro of dissociated ganglionic neurons. Proc Natl Acad Sci USA 69:3556-3560, 1972
- Burnstock G, Costa M: Adrenergic Neurons: Their organization, function and development in the peripheral nervous system. London, Chapman and Hall, 1975
- Cohen AI, Nicol EC, Richter W: Nerve growth factor requirement for development of dissociated embryonic sensory- and sympathetic ganglia in culture. Proc Soc Exp Biol-Med 116:784-789, 1964
- Craïn SM, Benitez H, Vatter AE: Some cytologic effects of salivary nerve-growth factor on tissue cultures of peripheral ganglia. Ann NY Acad Sci 118:206-230, 1964
- Craïn SM, Wiegand RG: Catecholamine levels of mouse sympathetic ganglia following hypertrophy produced by saliva

- ry nerve-growth factor. Proc Soc Exp Biol Med 107:663-665, 1961
- Cohen P, Salomon NH: Familial dysautonomia: case report - with autopsy. J Pediatr 46:663-670, 1955
- Cohen S, Levi-Montalcini R: A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom, Proc Natl Acad Sci USA 42:571-574, 1956
- Cohen S: Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic-antiserum. Proc Natl Sci Usa 46:302-311, 1960
- Chamley JH, Goller I, Burnstock G: Selective growth of sympathetic nerve fibers to explants of normally densely-innervated autonomic effector organs in tissue culture Dev Biol. 31:362-379, 1973
- Charlwood KA, Griffith MJ, Lamont MD, et al: Effects of nerve growth factor from the venom of Vipera russelli on sensory and sympathetic ganglia from the embryonic --- chick in culture. J Embryol Exp Morphol 32:239-252, - 1974
- Cohen S: Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake venom. J Biol Chem -- 234:1129-1137, 1959
- Charplain J, Malmfors T, Olson L, et al: Ontogenesis of pe-

- riphral adrenergic neurons in the rat: pre-and post-natal observation Acta Physiol Scand 80:276-288, 1970
- Dyck P, Ohta M: Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory neurons, Peripheral neuropathy. Vol 2. Edited by PJ Dyck, PK Thomas, EH Lambert, Philadelphia, Saunders, 1975, pp 791-824
- Edwards DC, Fenton EL, Hendry IA: Quantitative aspects of - the affects mice of nerve growth factor and its anti-serum. Nerve Growth Factor and Its Antiserum, Edited - by E Zaimis, J Knight. London, Athlone Press, 1972, -- pp 237-252
- Edwards DC, Fenton EL Kakari S, et al: Effects of nerve gro<sup>o</sup>wth factor in new-born mice, rats and kittens. J Phy-  
siol (Lond) 186:10P-12P 1966
- Enemar A, Falck B, Hå kanson R: Observations on the apperance of norepinephrine in the sympathetic nervous system of the chick embryo. Dev Biol 11:268-283, 1965
- Eranko L: Ultrastructure of the developing sympathetic nerve cell and the storage of catecholamines, Brain Res - 46:159-175, 1972
- Everson T C: Spontaneous regression of cancer. Ann N Y Acad Sci 114:721-735, 1964
- Fabricant RN, De Larco Todaro GJ: Nerve growth factor recepu



- tors on human melanoma cells in culture. Proc Natl -- Acad Sci USA 74:565-569, 1977
- Falck B, Hillarp N-A, Thiene G. et al: Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. J Histochem Cytochem 10:348-354, 1962
- Fernholm M: On the appearance of moncamines in the sympathetic and the chromaffin tissue in the mouse embryo. Z.-Anat Entwickl Gesch 135:350-361, 1972
- Frank BH, Veros AJ: Physical studies on preinsulin-association behavior and conformation in solution. Biochem -- Biophys Res Commun 32:155-160, 1968
- Frazier WA, Angeletti RH, Bradshaw RA: Nerve growth factor- and insulin: structural similarities indicate an evolutionary relationship reflected by physiological action. Science 176:482-488, 1972
- Frazier WA, Boyd LF, Bradshaw RA: Interaction of nerve growth with surfade membranes: biological competence of insolubilized nerve growth factor. Proc Natl Sci USA - 70:2931-2935, 1973
- Frazier WA, Boyd LF, Bradshaw RA: Properties of the specific binding of I-nerve growth factor to responsive peripheral neurons, J Biol Chem 249:5513-5519, 1974
- Frazier WA, Boyd LF Bradshaw RA: Splubilization of nerve --

- growth factor receptors of rabbit superior cervical - ganglia, J Biol Chem 251:5680-5685, 1976
- Frazier WA, Boyd LF, Pullian MW, et al: Properties and specificity of binding sites for I-nerve growth factor in embryonic heart and brain J Biol Chem 249:5918-5923, -- 1973
- Frazier WA, Hogue-Angeletti RA, Sherman R, AL: Topography of mouse 2.58 nerve growth factor: reactivity of tyrosine and tryptophan. Biochemistry 12:3281-3293, 1973
- Frazier WA, Ohlendorf CE, Boyd LF, et al: Mechanisms of -- action of nerve growth factor and cyclic AMP on neurite outgrowth in embryonic chick sensory ganglia: demonstration of independent pathways of stimulation, Proc Natl Acad Sci USA 0:2448-2452, 1973
- Freed WJ: The role of nerve-growth factor (NGF) in the central nervous system. Brain Res Bull 1:393-412, 1976
- Golstein MN, Brodeur GM, Ross D: The affect of nerve growth factor and dibutyryl cyclic AMP on acetylcholinesterase in human and mouse neuroblastoma. Anat Rec 175:330-1973
- Goldstein MN, Burdman JA, Journey LJ: Long-term tissue culture of neuroblastoma. II Morphologic evidence for differentiation and maturation. J Natl Cancer Inst 32:165-174, 1964

- Goldstein MN, Pinkel D: Long-term tissue culture of neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 20:675-680, 1958
- Grace JY Jr. Clinical aspects of immunity in untreated cancer. *Ann Ny Acad Sci* 114:736-746, 1964
- Grafstein B: The nerve cell body response to axotomy. *Exp Neurol* 48:32-51, 1975
- Greenberg RE, Winick M, Reilly TA: Studies of nerve-growth-promoting protein. I. Demonstration in human fetal tissue. *J Pediatr* 63:753-754, 1963
- Greene LA: A dissociated cell culture bioassay for nerve growth factor, *Neurobiology* 4:286-292, 1974
- Greene LA, Tischler AS: Establishment of a neuroadrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor, *Proc Natl Sci USA* 73:2424-2428, 1976
- Greenfield JG: *The Spino-cerebellar Degenerations*. Oxford - Blackwell, 1954
- Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: The preparation of <sup>125</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 89:114-123, 1963
- Haas DC, Hier DB, Arnason BGW, et al: On a possible relationship of cyclic AMP to the mechanism of action of nerve growth factor *Proc Natl Exp Biol Med* 140:45-47, 1972

- Halstead DC, Larrabee MG: Early effects of antiserum to the nerve growth factor in metabolism and transmission - in superior cervical ganglia of mice, Immunosympathectomy. Edited by G Steiner, E Schonbaum. New York, Elsevier, 1972, pp 231-236
- Hamberger B, Levi-Montalcini R, Norberg K-A et al: Monoamines in immunosympathectomized rats. *Int J Neuropharmacol* 4:91-95, 1965
- Hamburger V, Levi-Montalcini R: Proliferation, differentiation and regeneration in the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool* 111:457-501, 1949
- Herper GP, Pearce FL, Vernon CA: Production of nerve growth factor by the mouse adrenal medulla *Nature* 261:251-253 1976
- Hellstrom IE, Hellstrom KE, Pierce GE, et al: Demonstration of cell bound and humoral immunity against neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 60:1231-1238, 1968
- Hendry IA: A method to correct adequately for the change in neuronal size when estimating neuronal numbers after - nerve growth factor treatment, *J Neurocytol* 5:337-349, 1976
- Hendry IA, Campbell J: Morphometric analysis of rat supe---

- rior cervical ganglion after axotomy and nerve growth-factor treatment. J Neurocytol 5:351-360, 1976
- Hendry IA: Control in the development of the vertebrate sympathetic nervous system. Rev Neurosci 2:149-194, 1976
- Hendry IA: Developmental changes in tissue and plasma concentration of the biologically active species of nerve growth factor in the mouse, by using a two-site radioimmunoassay. Biochem J 128:1265-1272, 1972
- Hendry IA Iversen LL: Effects of nerve growth factor and its antiserum on tryrosine hydroxylase activity in mouse superior cervical sympathetic ganglion. Brain Res 29:159-162, 1971
- Hendry IA, Ivarsen LL: Reduction in the concentration of nerve growth factor in mice after sialectomy and castration. Nature 243:500-504, 1973
- Hendry IA, Stach R, Herrup K: Characteristics of the retrograde axonal transport system for nerve growth factor in sympathetic nervous system Brain Res 82:117-128, 1974
- Hendry IA, Stockel K, Thoenen H, et al: The retrograde axonal transport of nerve growth factor. Brain Res 68:103-121, 1974
- Hendry IA: The effects of axotomy on the development of the

- rat superior cervical ganglion. Brain Res 90:235-244, 1975
- Hendry IA, Thoenen H: Changes of enzyme pattern in the sympathetic nervous system of adult mice after submaxillary gland removal: response to exogenous nerve growth factor. J Neurochem 22:999-1004, 1974
- Hendry IA: The response of adrenergic neurones to axotomy and nerve growth factor. Brain Res 94:87-97, 1975
- Herrup K, Shooter EM: Properties of the Beta-nerve growth factor in development. J Cell Biol. 67: 118-125, 1975
- Herrup K Shooter E M: Properties of the Beta-nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. Proc Natl Acad Sci USA 70:3884-3888, 1973
- Hervonen H: Differentiation of sympathico blasts in culture of chick ganglia: light and electron microscopic, fluorescence and enzyme histochemical observations. Anat Embryol (Berl) 146:225-243, 1975
- Hier DB, Arnason BGW, Young M: nerve growth factor: relationship to the cyclic AMP system of sensory ganglia. Science 182:79-81, 1973
- Hier DB, Arnason BGW, Young M: Studies on the mechanism of nerve growth factor. Proc Natl Sci USA 69:2268-2272, 1972

- Hogue-Angeletti RA, Frazier WA, Jacobs JW et al: Purification, characterization, and partial amino acid sequence of nerve growth factor cobra venom. *Biochemistry* - 15:26-34, 1976
- Immunosympathectomy. Edited by G Steiner, E Schonbaum. Amsterdam, London, New York, Elsevier, 1972
- Iversen LL, Glowinski J, Axelrod J: Reduce uptake of tritiated noradrenaline in tissues of immunosympathectomized animals. *Nature* 206:1222-1223, 1965
- Jacobson M: *Developmental Neurobiology*. New York, Holt, Rinehart and Winston, 1970
- Jaffe N: Neuroblastoma: review of the literature and an examination of factors contributing to its enigmatic character. *Cancer Treat Rev* 3:61-82, 1976
- Johnson DG, Gorden P, Kopin IJ: A sensitive radioimmunoassay for 7S nerve growth factor antigens in serum and tissues *J Neurochem* 18:2355-2362, 1971
- Johson EM Jr, Alce L: Suppression of the in vitro and in vivo cytotoxic effects of guanethidine in sympathetic neurons by nerve growth factor. *Brain Res* 81:519-532, - 1974
- Johnson EM Jr: Destruction of the sympathetic nervous system of neonatal rats by vinblastine: preventing by con

- comitant administration of nerve growth factor (NGF) -  
Fed Proc 36:956, 1977
- Johnson RH, Spalding JM: Disorders of the Autonomic Nervous  
System, Philadelphia, Davis, 1974
- Kahn CR, Megyesi K, Bar Rs, et al: Receptors for peptide-  
hormones: new insights into the pathophysiology of di-  
sease in man. Ann Intern Med 86:205-219, 1977
- Kahn CR: Membrane receptors for hormones and neurotransmit-  
ters. Cell Biol 70:261-186, 1976
- Knapp S, Mandell AJ: Serotonin biosynthetic capacity of mou-  
se C-1300 neuroblastoma cells in culture. Brain Res --  
66:547-551, 1974
- Kolber AR, Godstein MN, Moore BW: Effects of nerve growth -  
factor on the expression of colchicine binding activi-  
ty and 14-3-2 protein in an established line of human-  
neuroblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 71:4203-4207, -  
1974
- Kumar S, Steward JK, Waghe M, et al: The administration of-  
the nerve growth factor to children with widespread --  
neuroblastoma. J. Pediatr Surg 5:18-22, 1970
- Kumar S, Steward JK, Waghe N: Nerve-growth factor in human-  
tumors. Lancet 2:234, 1972
- Larrabee MG: Metabolic effects of nerve impulses and nerve-



growth factor in sympathetic ganglia. Proc Brain Res - 31:95-110, 1969

Levi A, Cimino M, Mercanti D, et al: Interaction of nerve - growth factor with tubulin: studies on binding and induced polymerization. Biochim Biophys Acta 399:50-60, - 1975

Levi G, Lattes MG: Effects of a nerve growth factor on the - transport of amino acids in spinal ganglia from chick- embryos. Life Sci (2)7:827-834, 1968

Leung F Y, Griffiths J: Use of plasma catecholamine values - in diagnosing pheochromocytoma and neuroblastoma. Can - Med Assoc J 111:1321-1322, 1974

Levi-Montalcini R, Aloe L, Mugnaini E, et al: Nerve growth- factor induces volume increase and enhances tyrosine - hydroxylase synthesis in chemically axotomized sympa- thetic ganglia of newborn rats. Proc Natl Acad Sci USA 72:595-599, 1975

Levi-Montalcini R, Angeletti PU Biological properties of a - nerve growth promoting protein and its antiserum. Re- gional Neurochemistry: Proceedings of the fourth Inter- national Neurochemical Symposium, Edited by SS Kety. -- New York, Pergamon Press, 1961, pp 362-377

Levi-Montalcini R, Angeletti PU: Essential role of the ner

- ve growth factor in the survival and maintenance of -- dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve - cells in vitro. Dev Biol 7:653-659, 1963
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU: Immunosympathectomy. Pharmacol Res 18:619-628, 1966
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU: Nerve growth factor evaluation and perspectives, Nerve Growth Factor and Its Antiserum. Edited by E Zaimis, J Knight. London, Athlone Press, 1972, pp 46-58
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU: Nerve growth factor. Physiol Rev 48:534-569, 1968
- Levi-Montalcini R, Booker B: Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve-growth protein. Proc Natl Acad Sci USA 46:384-391, 1960
- Levi-Montalcini R, Boocker B: Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary glands. Proc Natl Acad Sci USA 46:373-384, -- 1960
- Levi-Montalcini R, Caramia F, Luse SA, et al: In vitro effects of the nerve growth factor on the fine structure - of the sensory nerve cells. Brain Res 8: 347-362, 1968
- Levi-Montalcini R, Hamburger V: Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympa-

- thetic nervous system of the chick embryo. J Exp Zool-  
116:321-362, 1951
- Levi-Montalcini R, Hamburger V: A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo- J Exp Zool 123:233-288, 1953
- Levi-Montalcini R, Meyer H, Hamburger V: In vitro experiments on the effects of mouse sarcoma 180 and 37 on -- the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo Cancer Res 14:49-57, 1954
- Levi-Montalcini R: Milestones unanswered questions and current studies on nerve growth factor. Proceedings of the Sixth International Congress of Pharmacology. Vol 2 Edited by L. Ahtee. Helsinki, Finnish Pharmacological Society, 1975 pp 221-229
- Levi-Montalcini R: Nerve-growth factor in familial dysautonomia. N Engl J Med 295:671-673, 1976
- Levi-Montalcini R, Revoltella R, Calissano P: Microtubule - proteins in the nerve growth factor and its target cell Recent Prog Horm Res 30:635-699, 1974
- Levi-Montalcini R; The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. Harvey -- Lect 60:217-259, 1964-1965

- Lieberman AR: Some factors affecting retrograde neuronal -  
 responsases to axonal lesions, Essays on the Nervous -  
 System. Edited by R Beilairs, EG Gray. Oxford, Cleren-  
 don Press, 1974, pp 71-105
- Lillie's Development of the Chick: An introduction to embr-  
 yology. Edited by HL. Hamilton. New York, Henry Holt -  
 and Company, 1952
- Liuzzi A, Pocchiari F, Angeletti PU: Glucose metabolism in-  
 embryonic ganglia: effects of the nerve growth factor-  
 (NGF) and insulin. Brain Res 7:452-454, 1968
- Marcholonis JJ: An enzymic for the iodination of immunoglo-  
 bulins and othe proteins Biochem J 113:299-305, 1969
- Martin RF. Beckwith JB: Lymphoid infililtrates in neuroblas-  
 toma: their occurrence and prognostic significance, J-  
 Pediatr Surg 3:161-164, 1968
- Mzel SB, Bamburg JR: Studies on the action of nerve growth-  
 factor H. Neurotubule protein levels during neurite --  
 outgrowth. Neurobiology 5:283-290, 1975
- Mobley WC, Schencker A, Shooter EM: Characterization and --  
 isolation of proteolytically modified nerve growth fac  
 tor Biochemistry 15:5543-5552, 1976
- Moore JB, Mobley WC, Shooter EM: Proteolytic modification -  
 of the beta nerve growth factor protein. Biochemistry-

13:833-840, 1974

Moore R Y, Bjorklund A, Stenevi U: Growth and plasticity of adrenergic neurons. The Neurosciences: Third study program. Edited by FO Schmitt FG Worden cambridge, MIT - Press, 1974, pp 961-977

Murray MR, Stout AP: Distinctive characteristic of the sympatheticoblastoma cultivated in vitro: a metho for prompt diagnosis, Am J Pathol 23:429-441, 1947

Murphy RA, Oger J, Saide JD, et al: Secretion of nerve growth factor by central nervous system glioma cells in culture. J Cell Biol 72:769-773, 1977

Murphy RA, Pantazis NJ, Armason BGW, et al: Secretion of a nerve growth factor by mouse neuroblastoma cells in culture, Proc Natl Acad Sci USA 72:1895-1898, 1975

Murphy RA, Singer RH, Saide JD, et al: Synthesis and secretion of nerve growth factor by muscle cell in culture. Soc Neurosci 2:587, 1976

Nerve Growth Factor and its Antiserum. Edited by E Zaimis, J London, Ahlone Press, 1972

Nelson P, Cristian C, Nirenberg M; Synapse formation between cional neuroblastoma x glioma hybrid cells and -astriated muscle cells, Proc Natl Acad Sci USA 73:123-127, 1976

- Nicolescu E, Kakari S, Zaimis E: Studies of tissue monoamines fluorescence microscopy, Nerve Growth Factor and its Antiserum Edited by E Zaimis, J Knight London, --- Athlone Press, 1972, pp 108-113
- Nikodijevic B, Nikodijevic O, Wong Yu M-Y, et al: The effect of nerve growth factor on cyclic AMP levels in superior cervical ganglia of the rat. Proc Natl Acad Sci USA 72:4769-4771, 1975
- Norr SC: In vitro analysis of sympathetic neuron differentiation from chick neural crest cell. Dev Biol 34:16--38, 1973
- Oger J, Arnason BGW, Pantazis N, et al: Synthesis of nerve-growth factor by L and 3T3 cells in culture. Proc Natl Acad Sci USA 71:1554-1558, 1974
- Olson L, Malmfors T: Growth characteristics of adrenergic -- nerves in the adult rat. Acta Physiol Scand (Suppl) -- 348:1-112, 1970
- Olson L: Outgrowth of sympathetic adrenergic neurons in --- mice treated with a nerve growth factor. Z Zellforsch-Mikrosk Anat 81:155-173, 1967
- Owman C, Sjöberg N-O, Swedin G: Histochemical and chemical-studies on pre and postnatal development of the different systems of "short" and "long" adrenergic neurons

in peripheral organs of the rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 116:319-341, 1971

Pantazis NJ, Blanchard MH, Arnason BGW, et al: Molecular properties of the nerve growth factor secreted by L cells *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1492-1496, 1977

Pannese E: Developmental changes of the endoplasmic reticulum and ribosomes in nerve cells of the spinal ganglia of the domestic fowl. *J Comp Neurol* 132:331-364, 1968

Idem: Electron microscopical study on the development of the satellite cell sheath in spinal ganglia. *J Comp Neurol* 135:381-422, 1969

Papadaki L: Fine structural changes in sympathetic ganglia of animals treated with nerve growth factor, *Nerve Growth Factor and Its Antiserum* Edited by Zaimis. J Knight. London Athlone Press 1972, pp 89-101

Paravicini U, Stoeckel K, Thoenen H: Biological importance of retrograde axonal transport of nerve growth factor in adrenergic neurons *Brain Res* 84:279-291, 1975

Partlow LM, Larrabee MG: Effects of a nerve-growth factor, embryo age and metabolic inhibitors on growth of fibers and protein in embryonic sympathetic ganglia. *J Neurochem* 18:2101-2118, 1971

Pearson J, Axelrod F, Dancis J: Current concepts of dysauto

- nomia: neuropathological defects. Ann NY Acad Sci 228: 288-300, 1974
- Pearson J, Budzilovich G, Finegold MJ: Sensory, motor and - autonomic dysfunction: the nervous system in familial-dysautonomia. Neurology (Minneap) 21:486-493, 1971
- Pinsky L, DiGeorge AM: Congenital familial sensory neuropathy with anhidrosis. J Pediatr 68:1-13, 1966
- Pochedly C: Neuroblastoma, Acton, Massachusetts, Publishing Sciences Group, 1976
- Prasad KNB, Kumar S: Demonstration of cholinergic cells in - human neuroblastoma and ganglioneuroma J Pediatr 82: - 677-678, 1973
- Prasad K N: Differentiation of neuroblastoma cells in cultu re. Biol Res 50:129-165, 1975
- Reynolds CP, Pérez-Polo JR: Human neuroblastoma: glial in-- duced morphological differentiation Neurosci Lett 1: - 91-97, 1975
- Revoltella R, Bertolini L, Pediconi M, et al: Specific bin- ding of nerve growth factor (NGF) by murine C 1300 neu roblastoma cells. J Exp Med 140:437-451, 1974
- Roisen FJ, Murphy RA, Pichichero ME et al: Cyclic adenosine monorhosphate stimulation of axonal elongation. Scien ce 175:73-74, 1972



- Russell DS, Rubinstein IJ: Pathology of Tumours of the Nervous System Fourth edition. London Edward Arnold 1977
- Sabatini MT, Pellegrino de Iraldi A, De Robertis E: Early effects of antiserum against the nerve growth factor on fine structure of sympathetic neurons. *Exp Neurol* 12: 370-383, 1965
- Schucker F: Effects of NGF-antiserum in sympathetic neurons during & early postnatal development. *Exp Neurol* 36: 59-78, 1972
- Schenkein I, Bueker ED, Heison L, et al: Increased nerve-growth-stimulating activity in disseminated neurofibromatosis, *N Engl J Med* 290:613-614, 1974
- Schwab ME, Thoenen H: Early effects of nerve growth factor on adrenergic neurons: an electron microscopic morphometric study of the rat superior cervical ganglion. *Cell Tissue Res* 158:543-553, 1975
- Server AC, Shooter EM: Nerve growth factor. *Adv Protein Chem* 31:339-409, (in press)
- Siggers DC, Boyer SH, Eldridge R: Nerve-growth factor in disseminated neurofibromatosis. *N Engl J Med* 292:1134, 1975
- Siggers DC: Nerve growth factor and some inherited neurological conditions. *Proc R Soc Med* 69:183-184, 1976

- Siggers DC, Rogers JG, Boyer SH, et al: Increased nerve-growth-factor beta-chain cross-reacting material in familial dysautonomia. *N Engl J Med* 295:629-634, 1976
- Stenevi U, Bjerre B, Bjorklund A, et al: Effects of localized intracerebral injections of nerve growth factor on the regenerative growth of lesioned central noradrenergic neurones *Brain Res* 69:217-234, 1974
- Stockel K, Schwab M, Thoenen H: Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. *Brain Res* 99:1-16, 1975
- Stoeckel K, Schwab M, Thoenen H: Specificity of retrograde-transport of nerve growth factor (NGF) in sensory neurons: a biochemical and morphological study. *Brain-Res* 89:1-14, 1975
- Stockel K, Solomon F, Paravicini U, et al: Dissociation between effects of nerve growth factor on tyrosine hydroxylase and tubulin-synthesis in sympathetic ganglia. *Nature* 250:150-151, 1974
- Stockel K, Thoenen H: Retrograde axonal transport of nerve-growth factor: specificity and biological importance - *Brain Res* 85:337-341, 1975
- Stockel K, Thoenen H: Specificity and biological importance

of retrograde axonal transport of nerve growth factor. Proceedings of the Sixth International Congress of --- Pharmacology Vol. 2 Edited by L Antee, Helsinki, Finnish Pharmacological Society. 1975 pp 285-296

Sutter A, Riopelle RJ, Harris-Warrick RM, et al: Characterization of two distinct classes of high affinity binding sites for nerve growth factor on sensory ganglion cells from chick embryos, Seventh annual meeting of -- the Society for Neurosciences, Anaheim (In press)

Swanson AG, Buchan GC, Alvord EC Jr: Anatomic changes in -- congenital insensitivity to pain: absence of small -- primary sensory neurons in ganglia, roots, and Lissauer's tract. Arch Neurol 12:12-18, 1965

Swanson AG: Congenital insensitivity to pain with anhydrosis: a unique syndrome in two male siblings. Arch Neurol 8:299-306, 1963

Takasugi M, Mickey MR, Terasaki PI: Studies on specificity of cell mediated immunity to human tumors. J Natl Cancer Inst 53:1527-1538, 1974

Tennyson VM: Electron microscopic study of the developing neuroblast of the dorsal root ganglion of the rabbit embryo. J Comp Neurol 124:267-318, 1965

Tennyson VM, Mytilineou C: Fluorescence and electron micro

scopin studiens of sympathoblasts in the fetal rabbit,  
SIF Cells: Structure and function of the small inten-  
sely fluorescent sympathetic cells (DHEW Publication -  
No. (H1H) 76-942). Edited by O Eranko. Washington, DC,  
Fogarty International Center, 1977, pp 35-53

Thoenen H, Angeletti PU, Levi-Montalcini R et al: Selective  
induction by nerve growth factor of tyrosine hydroxy-  
lase and dopamine Beta-Hydroxylase in the rat superior  
cervical ganglion. Proc Natl Acad Sci USA. 68:1598- --  
1602, 1971

Thoenen H, Saner A, Angeletti PU, et al: Increased activity  
of choline acetyltransferase in sympathetic ganglia --  
after prolonged administration of nerve growth factor.  
Nature (New Biol) 236:26-28, 1972

Theonen H: Surgical, immunological and chemical sympathec-  
tomy their application in the investigation of the phy-  
siology and pharmacology of the sympathetic system. --  
Catecholamines. Edited by H Blaschko, E Muscholl New -  
York, Springer-Verlag 1972, pp 813-844

Tischler AS, Dichter MA, Biales B, et al: Neural properties  
of cultured human endocrine tumor cells of proposed -  
neural crest origin Science 192:902-904, 1976

Tischler AS, Greene LA: Nerve growth factor induced process

- formation by cultured rat pheochromocytoma cell. *Nature* 258:341-342, 1975
- Tischler AS: Quantitation of nerve-growth-stimulating activity. *N Engl J Med* 290:1203, 1974
- Tranzer JP, Thoenen H: An electron microscopic study of selective acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine. *Experientia* 24:155-156, 1968
- Turkel SB, Itabashi HH: The natural history of neuroblastic cells in the fatal adrenal gland. *Am J Pathol* 76:225-244, 1974
- Ungerstedt U: Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol (Suppl)* 367:1-48, 1971
- Varon S: Glia, nerve growth factor and ganglionic metabolism, *Proceedings of the Sixth International Congress of Pharmacology*. Vol 2. Edited by J Tuomisto, MK Paasonen. Finnish Pharmacological Society, 1975, pp 275-284
- Varon S: Nerve growth factor and its mode of action. *Exp Neurol* 48:75-92, 1975
- Varon S, Nomura J, Shooter EM: Subunit structure of a high-molecular-weight form of the nerve growth factor from mouse submaxillary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 57: -

1782-1789, 1967

Idem: The isolation of mouse nerve growth factor in a high molecular weight form. *Biochemistry* 6:2202-2209, 1967

Idem: Reversible dissociation of mouse nerve growth factor protein into different subunits. *Biochemistry* 7: 1296-1303, 1968

Varon S, Raiborn C, Burnham P: Comparative effects of nerve growth factor and ganglionic nonneuronal cells on purified mouse ganglionic neurons in culture. *J Neurobiol* 5:355-371, 1974

Waghe M, Kumar S, Steward JK: Nerve growth factor in human sera. *J Pediatr Surg* 5:14-17, 1970

Waris T, Rechartd L, Waris P: Differentiation of neuroblastoma cells induced by nerve growth factor in vitro. -- *Experientia* 29:1128-1129, 1973

Weis P: The "in vitro" effect of the nerve growth factor on chick embryo spinal ganglia-a light-microscopic evaluation. *J Embryol Exp Morphol* 24:381-392, 1970

Weis P: The "in vitro" effects of the nerve growth factor on chick embryo spinal ganglia: an electron microscopic evaluation. *J Comp Neurol* 141:117-132, 1971

Weston JA: A radioautographic analysis of the migration and

- localization of trunk neural crest cells in the chick.  
Dev Biol 6:279-310, 1963
- Winick M, Greenberg RE: Appearance and localization of a --  
nerve growth-promoting protein during development, ---  
Pediatrics 35:221-228, 1965
- Winick M, Greenberg RE: Chemical control of sensory ganglia  
during a critical period development. Nature 205:180--  
181, 1965
- Wlodawer A, Hodgson KD, Shooter EM: Crystallization of ner-  
ve growth factor from mouse submaxillary glands. Proc-  
Natl Acad Sci USA 72:777-779, 1975
- Yamada KM, Wessells NK: Axon elongation: effect of nerve --  
growth factor on microtubule protein. Exp Cell Res 66:  
346-352, 1971
- Yates RD: A study of cell division in chick embryonic gan--  
glia. J Exp Zool 147:167-182, 1961
- Young M, Oger J, Blanchard MH, et al: Secretion of a nerve-  
growth factor by primary chick fibroblast cultures. --  
Science 187:361-362, 1975
- Zaimis E Berk L, Callingham BA: Morphological bloche  
mical and funcional changes in the sympathetic -  
nervous system of rats treated with nerve growth  
factor-antiserum Nature 206:1220-1222, 1965

Zaimis E: Nerve growth factor: the target cells, Nerve Growth Factor and Its Antiserum Edited by E Zaimis, J Knight. London, Athlone Press, 1972, - pp 59-70