



03086
2
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

LIBERACION IN - VIVO DE PROTEINAS DE NUEVA SINTESIS
DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

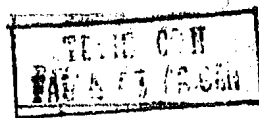
- DESARROLLO METODOLOGICO-

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A

ARIE S. OKSENBERG SHLIMOFF



MEXICO, D. F.

MAYO 1987



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 DE CONTENIDOS

PAGINA

AGRADECIMIENTOS	2
INDICE DE CONTENIDOS	3
INDICE DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	12
INTRODUCCION	13

ANTECEDENTES

I. -	INTRODUCCION	16
II. -	PROTEINAS DEL TEJIDO NERVIOSO	18
	A. - CAMBIOS DURANTE EL DESARROLLO DEL <u>SNC</u> .	
	B. - CARACTERIZACION DE PATRONES PROTEICOS.	
	C. - PROTEINAS ESPECIFICAS DEL <u>SNC</u> .	
III. -	PROTEINAS DEL LIQUIDO CEFALORAQUIDEO	28
IV. -	PROTEINAS DEL LIQUIDO EXTRACELULAR	32
V. -	SINTESIS DE PROTEINAS CEREBRALES	35
	A. - GENERALIDADES	
	B. - METODOS PARA LA MEDICION DE LA SINTESIS PROTEICA.	
	1. - ESTUDIOS IN - VITRO	
	2. - ESTUDIOS IN - VIVO	
	C. - LOCALIZACION DE LA SINTESIS	
	1. - SOMA CELULAR	
	2. - AXON	
	3. - MITOCONDRIA Y MEMBRANA SINAPTICA	

VI.- CAMINO INTRACELULAR DE PROTEINAS LIBERABLES	47
VII.- TRANSPORTE AXONAL	51
A.- GENERALIDADES	
B.- TRANSPORTE LENTO Y RAPIDO	
VIII.- TRANSPORTE DENDRITICO	55
IX.- TOPOGENESIS PROTEICA INTRACELULAR.	59
X.- PROCESAMIENTO DE PROTEINAS EN TERMINALES SINAPTICAS	65
A.- DEGRADACION LOCAL	
B.- TRANSPORTE AXONAL RETROGRADO RAPIDO	
C.- PROCESO DEGENERATIVO	
D.- SECRECION DE PROTEINAS	
E.- RENOVACION DE PROTEINAS SINAPTICAS	
XI.- LIBERACION DE PROTEINAS	70
A.- LIBERACION DE PROTEINAS EN SISTEMAS IN-VITRO	
1.- ESTUDIOS EN LA UNION NEUROMUSCULAR	
2.- ESTUDIOS EN REBANADAS DE TEJIDO NERVIOSO	
3.- ESTUDIOS EN CELULAS GLIALES	
4.- ESTUDIOS EN CULTIVO DE TEJIDO NEURONAL	
B.- LIBERACION DE PROTEINAS EN SISTEMAS IN - VIVO	
1.- LIBERACION HACIA EL <u>LCR</u>	
2.- LIBERACION HACIA EL <u>LEC</u>	
XII.- LIBERACION IN-VITRO E IN-VIVO DE PROTEINAS CON ACTIVIDAD ENZIMATICA	95
A.- ACETILCOLINESTERASA (AChE)	
B.- DOPAMINE β - HIDROXILASA (DBH)	

XIII.-	TRANSFERENCIA DE PROTEINAS GLIALES HACIA EL AXON	118
XIV.-	TRANSFERENCIA TRANSNEURONAL DE PROTEINAS	122
	A.- ESTUDIOS EN EL SISTEMA VISUAL	
	B.- ESTUDIOS EN LOS SISTEMAS VESTIBULAR Y AUDITIVO	
XV.-	LIBERACION DE PROTEINAS Y EL CICLO SUERO-VIGILIA.	132
XVI.-	METODOS PARA EL ESTUDIO IN-VIVO DE LIBERACION DE SUSTANCIAS NEUROACTIVAS EN EL SNC.	138
	A.- CANULA PUSH-PULL	
	1.- FUNCIONAMIENTO DE LA CANULA PUSH - PULL	
	2.- VENTAJAS DE LA CANULA PUSH - PULL	
	3.- DESVENTAJAS DE LA CANULA PUSH - PULL	
	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	146
	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	148

MATERIALES Y METODOS

I.-	SISTEMA DE PERFUSION	149
II.-	IMPLANTACION DE ANIMALES	150
III.-	ADMINISTRACION DEL PRECURSOR RADIOACTIVO	152
IV.-	FORMAS DE INCORPORAR EL PRECURSOR RADIOACTIVO	153
	A.- PERFUSION CONTINUA DEL PRECURSOR	
	B.- PULSO UNICO DEL PRECURSOR	
V.-	DESARROLLO DE UN EXPERIMENTO TIPO	156
VI.-	PROCESAMIENTO DE FRACCIONES COLECTADAS	157
VII.-	TECNICA DE MANS Y NOVELLI	158
VIII.-	TECNICA DE LOWRY	160

DESARROLLO EXPERIMENTAL

I.-	CONTROLES DE LA TECNICA DE MANS Y NOVELLI	162
II.-	EXPERIMENTOS CON GATOS	165
III.-	EXPERIMENTOS CON RATAS	172

DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

I.-	ANALISIS DE NIVELES BASALES	209
II.-	ANALISIS DE "COLECCIONES ESTIMULADAS"	212
III.-	EFECTO DE Ca ⁺⁺ EN LA LIBERACION DE PROTEINAS	216
IV.-	ORIGEN CELULAR DE PROTEINAS LIBERABLES	218
V.-	IDENTIFICACION DE PROTEINAS LIBERABLES	222
VI.-	MECANISMOS DE LIBERACION	223
VII.-	POSIBLES FUNCIONES DE PROTEINAS LIBERABLES	227
	REFERENCIAS	233

INDICE DE FIGURAS

PAGINA

I.-	Eficiencia de la técnica de lavados de discos MANS y NOVELLI.	163
II.-	Perfusión en el núcleo caudado de un gato que recibió el precursor (D-GLUC-14C) de forma continua.	167
III.-	Perfusión en el núcleo caudado de un gato que recibió un pulso único del precursor (MET-35S) 30 minutos antes del inicio de la perfusión.	170
IV.-	Perfusión en el núcleo caudado de un gato que recibió un pulso único del precursor (MET-35S) 4 horas antes del inicio de la perfusión.	171
V.-	Difusión de la marca radioactiva a otras regiones del cerebro.	173
VI.-	Inyección de MET-35S a: homogenado de tejido, tejido aislado íntegro y agua.	175
VII.-	Recuperación de MET-35S del tejido (núcleo caudado) variando la velocidad y el volumen de inyección.	178
VIII.-	Curso temporal de: eliminación de marca total en el tejido e incorporación de marca a proteína tisular.	181
IX.-	Curso temporal de la eliminación de la marca radioactiva (MET-35S) y su incorporación a proteína tisular (núcleo caudado) hasta 72 horas posterior a la inyección de un pulso único.	182
X.-	Curso temporal de la incorporación de MET-35S a proteína tisular. (porcentajes de incorporación)	184
XI.-	Valores basales de proteínas marcadas radioactivamente obtenidas en el curso de perfusiones, dependiendo del tiempo entre la inyección de MET-35S y la iniciación de la perfusión.	187
XII.-	Perfusión ejemplo.	189
XIII.-	Curva promedio de perfusiones (A).	192

XIV.-	Cueva promedio de perfusiones (B).	195
XV.-	Curva promedio de perfusiones (C).	197
XVI.-	Curva promedio de perfusiones (D).	198
XVII.-	Efecto de la estimulación con alto K^+ y la estimulación mecánica sobre los niveles de proteínas marcadas y proteínas totales.	200
XVIII.-	Efecto de la omisión de Ca^{++} sobre los niveles de proteínas marcadas.	202
XIX.-	Proteínas totales, proteínas marcadas y etapas de sueño en la rata.	205

ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervioso Central.
MOR	Movimientos Oculares Rápidos.
MET	Metionina.
GLUC	Glucosa.
PAGE	Electroforesis en geles de Poliacrilamida.
ARNm	Acido Ribonucleico (mensajero).
LEU	Leucina.
LCR	Líquido Céfalorraquídeo.
LDH	Láctico Deshidrogenasa.
CPK	Creatinina Fosfoquinasa.
Chat	Colin-acetiltransferasa.
AChe	Acetilcolinesterasa.
Ach	Acetilcolina.
ChE	Colinesterasa.
DBH	Dopamina β - Hidroxilasa.
COMT	Catecol -o- Metiltransferasa.
INMT	Indolamina -m- Metiltransferasa.
P.M.	Peso Molecular.
SDS	Sodio Dodecil Sulfato.
t 1/2	Tiempo de vida media.
GAPP	Proteína Fibrilar Acida Glial.
Pi	Punto Isoeléctrico
ATP	Adenosina Trifosfato.
ADP	Adenosina Difosfato.
EDTA	Acido Tetracético Diaminetileno.

A. E.	Actividad Especifica.
TIR	Tirosina.
VAL	Valina.
I. P.	Intra-peritoneal.
LEC	Líquido Extracelular.
MAO	Monoamino Oxidasa.
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso.
GAD	Decarboxilasa del Acido Glutámico.
PTG	Proteínas Transportadas de Glia.
BSA	Albumina de Suero de Bovino.
MRL	Material Reactivo a LOWRY.
EDL	Músculo Extensor Digitorum Longus.
PLP	Potenciación a Largo Plazo.
TCA	Acido Tricloroacético.
PCG2	Linea G2 de cultivo de células feocromocitomas.
PC12	Linea 12 de cultivo de células feocromocitomas.
NT	Neurotransmisor.
FCN	Factor de Crecimiento Nervioso.
pCMBS	Acido Sulfónico-paracloromercuribenzeno.
5-HIAA	Acido 5 - hidroxyindolacético.
HVA	Acido Homovanílico.
5-HT	5 - Hidroxitriptamina.
CPZ	Clorpromacina.
CN	Cisterna Magna.
VL	Ventriculo Lateral.
SN	Sustancia Nigra.
HL	Hipotálamo Lateral.
NC	Núcleo Caudado.

C-NS	Colinesterasa no - específica.
DA	Dopamina.
6-HD	6- Hidroxidopamina.
A-P	Amino - Peptidasa.
PRO	Prolina.
NGL	Núcleo Genuculado Lateral.
AGT	Aglutinado de Germen de Trigo.
Co	Cobalto.
PR	Peroxidasa de Rábano.
Ba	Bario.
HC	Hormona de Crecimiento.
PGO	Ponto-Genículo-Occipital.
MUA	Actividad Multiunitaria.
FRM	Formación Reticular Mesencefálica.
NE	Norepinefrina.
EEG	Electroencefalograma.
EMG	Electromiograma.
EOG	Electroculograma.
VER	Veratridina.
TTX	Tetrodoxina.
REL	Retículo Endoplásmico Liso.
uCi	Micro Curie.
PSM	Potencial Sináptico Miniatura.

RESUMEN

Las proteínas son sin duda uno de los componentes más importante de toda célula viviente. La importancia de este hecho radica fundamentalmente en la gran variedad de funciones que estas moléculas pueden llevar a cabo.

En las células nerviosas, las proteínas juegan un papel vital, ya que sin ellas no solo la estructura sino todas las funciones que estas células ejecutan se verían drásticamente dañadas.

El análisis del líquido extracelular del tejido nervioso muestra la existencia de una cantidad apreciable de proteínas cuyo origen se desconoce. Existen tres posibles fuentes de origen de estas proteínas: la sangre, el líquido céfalorraquídeo y las células nerviosas.

En este estudio se desarrolló una estrategia experimental con el propósito de dilucidar si existe el fenómeno de liberación de proteínas de células nerviosas. De esta manera podremos verificar si al menos parte de las proteínas del líquido extracelular tienen un origen tisular.

Para el objetivo ya mencionado, usamos un desarrollo experimental que consistió en: 1) la aplicación tópica de un precursor radioactivo de proteínas (NEF-35S) sobre un sitio anatómico determinado (Núcleo Caudado) con el propósito de marcar específicamente proteínas de ese núcleo celular. 2) Posterior a un tiempo de espera, (para que las células capturen el precursor radioactivo y lo incorporen a proteínas de nueva síntesis) se procede a la perfusión y colección del líquido extracelular de ese sitio anatómico específico mediante el empleo de una cánula push-pull. De esta manera es posible analizar si parte de las proteínas obtenidas durante la perfusión (que posibilita un muestreo continuo del líquido extracelular de ese microambiente celular específico) contienen la marca radioactiva.

Los resultados de este estudio mostraron la presencia de proteínas marcadas radioactivamente en el perfusado. Estos resultados permiten definir el origen tisular de una población de proteínas del líquido extracelular e investigar la posibilidad de su liberación por células nerviosas.

Otros resultados del presente estudio mostraron que al tratar el tejido con concentraciones altas de K^+ (50 mM), que actúa como agente despolarizante, se evoca una mayor liberación tanto de proteínas recién sintetizadas como de proteínas totales. Por otra parte, evidencias preliminares en relación a la dependencia de Ca^{++} , podrían sugerir que el mecanismo de liberación de estas proteínas marcadas radioactivamente, podría distar de la liberación clásica de neurotransmisores.

Por último este estudio muestra como el método que he desarrollado se podía aplicar para un entendimiento más cabal sobre la correlación que al parecer existe entre niveles de proteínas liberables al espacio extracelular con el control del ciclo sueño-vigilia en un animal en libre movimiento.

INTRODUCCION

La liberación de sustancias neuroactivas de células nerviosas juega, sin duda alguna, un papel crucial en los mecanismos de transmisión de la información nerviosa. En los últimos años no solo se ha ampliado el conocimiento sobre los mecanismos que regulan la liberación de dichas sustancias sino que además hoy es claro que los llamados "neurotransmisores clásicos" representan solo un subgrupo dentro de un creciente grupo de sustancias neuroactivas, liberables de células nerviosas y con capacidad de modificar la transmisión de la información nerviosa.

De esta manera una gran cantidad de estudios han revelado que células nerviosas liberan sustancias como péptidos y aminoácidos los cuales participan activamente en los mecanismos de comunicación neuronal. Sin embargo la lista de sustancias neuroactivas liberables de células nerviosas no concluye aquí. Recientemente, diversos grupos de investigación han sugerido que también se liberarían proteínas de células nerviosas y que además podrían participar en importantes funciones del SNC.

Por ejemplo, Drucker-Colín y col (1975b), mostraron evidencias que señalan la existencia de altos niveles de proteínas en el líquido extracelular de la Formación Reticular Mesencefálica e Hipocampo, en concomitancia con periodos de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) en el gato. A pesar de que una serie de evidencias (Oswald, 1966; Adam, 1980) sugieren que estos resultados son un correlato de

Una mayor síntesis proteica cerebral en paralelo con periodos de sueño MOR, la demostración experimental de este fenómeno aun no se ha realizado. Aún mas, debido a que las proteínas representan uno de los componentes mas importantes no solo de células nerviosas sino también de la sangre y del líquido cefalorraquídeo, es fundamental definir la fuente de origen de las proteínas encontradas en el espacio extracelular. En otras palabras, es importante desarrollar una estrategia experimental adecuada que permita definir si las proteínas encontradas en el líquido extracelular son el resultado de la liberación de las mismas por las células nerviosas o si su presencia en el LEC corresponde a un fenómeno diferente que sería imperioso poder dilucidar.

El objetivo principal de este estudio fue desarrollar una estrategia experimental que permita definir in-vivo el origen de las proteínas encontradas en el líquido extracelular y de esta manera definir con certeza la existencia de la liberación de proteínas de células nerviosas.

La estrategia experimental usada en este trabajo consistió en la aplicación tópica de un precursor radioactivo de proteínas (MET-35S o GLUC-14C) sobre un sitio anatómico determinado (Nucleo Caudado) con el objeto de marcar radioactivamente proteínas de ese núcleo celular. Si existe una población de proteínas liberables de células nerviosas, un análisis del líquido extracelular de ese microambiente tisular, debiera mostrar que por lo menos parte de las proteínas encontradas, contiene en su estructura el precursor

radioactivo. Si este es el caso no cabe duda que la síntesis de estas proteínas se llevó a cabo en células nerviosas de ese sitio específico y por lo tanto define el origen tisular de las mismas.

El uso de la cánula push-pull, que permite perfusiones localizadas del tejido nervioso (y por ende posibilita la obtención de un muestreo continuo de los eventos neuroquímicos que ocurren en el espacio extracelular de ese sitio anatómico) en animales en libre movimiento, representó un método adecuado para los objetivos ya mencionados.

El logro más importante del presente estudio, fue haber desarrollado una estrategia experimental que permitió demostrar "in - vivo" la existencia de la liberación de proteínas "recién sintetizadas" (que incorporaron el precursor radioactivo) en células nerviosas y con ello haber definido el origen tisular de por lo menos parte de las proteínas encontradas en el líquido extracelular.

Por otra parte este estudio mostró que la manipulación del tejido nervioso con un agente depolarizante (50 mM de K^+) evoca una mayor liberación de proteínas totales y recién sintetizadas. Sin embargo, se muestran también evidencias de que esta liberación podría diferir de la clásica liberación de neurotransmisores en relación a la dependencia de Ca^{++} .

Por último este estudio muestra como este método se podría aplicar para un mejor entendimiento sobre la correlación de niveles de proteínas recién sintetizadas y liberables al espacio extracelular y niveles de sueño MOR en un animal en libre movimiento.

ANTECEDENTES.

I.- INTRODUCCION.

El estudio de las proteínas del sistema nervioso central (SNC) se ha desarrollado de manera sorprendente en los últimos años. Este desarrollo radica fundamentalmente en dos hechos importantes: 1) El desarrollo de nuevas técnicas y métodos para la extracción, separación, purificación y caracterización de las mismas; y 2) El interés de los neurocientíficos por ampliar y profundizar sus conocimientos sobre la diversidad funcional de estas moléculas. Sin embargo, es importante mencionar que este desarrollo ha sido muy tardío en relación al estudio de proteínas de otros sistemas, y las causas han sido, sin duda alguna, la existencia de diversos problemas metodológicos.

1) Extracción de Proteínas.- El uso general de métodos acuosos para la extracción protéica de algunos órganos, no funciona adecuadamente para el cerebro, pues no se obtienen cantidades adecuadas. Sólo entre un 10-20% del total protéico es extraído por una o más homogenizaciones en Buffer acuoso. (Bogoch, 1969). Además, lo extractado está por lo general asociado fuertemente con lípidos.

El uso de solventes orgánicos para remover los lípidos del tejido nervioso y así permitir la determinación del contenido protéico lleva consigo dos serios problemas: La

solubilización de una pequeña fracción del contenido protéico total y también al mismo tiempo, la desnaturación del resto protéico del tejido. De esta manera lo que queda son residuos protéicos insolubles, difíciles de tratar, con lo que se imposibilita a través de este método establecer el contenido exacto de proteínas en el tejido nervioso.

2) Proteínas Conjugadas. - Otro gran problema para el estudio de las proteínas del SNC es el hecho de que la mayoría de éstas, son proteínas conjugadas. Es decir, están unidas, ya sea por unión covalente o por otro tipo de unión fuerte a carbohidratos, a residuos ricos en fósforo, a lípidos o a residuos de ácidos nucleicos.

3) Origen Membranal. - Los problemas antes mencionados: extracción, solubilidad, conjugación con otro tipo de sustancias, están todos directamente relacionados con el hecho de que el cerebro es un órgano cuyo tejido posee una complejidad membranal única. Por ende, un gran porcentaje del contenido protéico está formando parte de una geometría membranal tridimensional.

4) Variación Estructural según el Estado Funcional. - Unido a los problemas ya mencionados, existen muchas evidencias que parecen indicar que el grado de conjugación con otras sustancias y la concentración de una fracción protéica determinada, suelen variar marcadamente según el estado funcional que se encuentre el SNC en un momento dado.

Esta breve mención sobre algunos de los problemas

metodológicos que representa el estudio de las proteínas del SNC tiene como objetivo recalcar el hecho de que como en otras áreas del conocimiento científico, el estudio de las proteínas cerebrales se ha retrasado entre otras cosas, debido a la existencia de diversos problemas metodológicos.

II.- PROTEINAS DE TEJIDO NERVIOSO

A.-Cambios durante el desarrollo del SNC

La información que existe en relación al contenido protéico total del tejido nervioso, proviene de datos muy antiguos. Existe el dato del cerebro de humano de que aproximadamente un 8 - 10% del tejido nervioso adulto (tejido fresco) está constituido por proteínas, un 10 - 12% de lípidos, 8% de carbohidratos y un 75% de H₂O, (Macartur y Doisy, 1918-9).

Sin embargo estos valores varían durante el desarrollo del tejido nervioso. El contenido absoluto de nitrógeno que refleja principalmente a las proteínas del cerebro, muestra un aumento proporcional con la edad. En un estudio realizado en ratas, Clouet y Gaidote (1956) mostraron que el contenido total de nitrógeno por cerebro (mgs) varía de 0.76 (5 días antes del parto) hasta 21.38 mgs (245 días post-partum). El contenido protéico en porcentaje del peso húmedo varía de 7.72 - 10.38%, durante este período.

Cuando se comparó el contenido proteico en 6 regiones diferentes del SNC, se observó que también existe una

variación en relación a la edad de la rata.

En ratas jóvenes (7-17 días) el contenido protéico de las 6 regiones analizadas disminuyó como sigue: Médula > hipotálamo > cerebelo > mesencéfalo > bulbo olfatorio > corteza. En ratas adultas 52-84 días no ocurrió lo mismo. Mesencéfalo > corteza > cerebelo > hipotálamo > bulbo olfatorio > médula. Sin embargo, la significancia de estos resultados aún se desconoce.

Estudios más recientes y realizados en otras especies han mostrado también que durante el desarrollo postnatal, el cerebro lleva a cabo un aumento considerable del contenido protéico, el cual es reflejo de la proliferación de células gliales, mielinización, procesos de arborización dendrítica, y además un aumento en terminales nerviosas, mitocondrias y elementos axonales. Sin embargo el contenido protéico de las fracciones microsomal, ribosomal y elementos solubles, disminuye gradualmente durante el desarrollo postnatal.

Al respecto Kelly y Luttiges, (1976), mostraron que una característica importante de la maduración cerebral es la constancia relativa de concentración de proteínas individuales en cada fracción subcelular.

Los datos mencionados anteriormente tienen como propósito principal, mostrar (aunque de manera muy simple) que durante el desarrollo del SNC, las proteínas cerebrales se encuentran en una dinámica de continuo cambio hecho que sugiere que las proteínas cerebrales juegan un papel importante en el desarrollo de este sistema.

B.- Caracterización de Patrones Proteicos

La utilidad de la electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE) como una herramienta de alta resolución para separar complejas mezclas de proteínas según su masa y carga (O'Farrell, 1975), ha posibilitado la investigación de los componentes proteicos de diferentes tejidos periféricos y de fluidos del cuerpo (Anderson y Anderson, 1977; Anderson y col, 1979; Merrill y col, 1979; Edward y col, 1981). Evidentemente estas observaciones proveen una herramienta muy útil sobre todo para examinar alteraciones en los patrones proteicos originados ya sea en enfermedades o producto de la administración de algún agente farmacológico.

Sin embargo, pocas investigaciones han aplicado esta técnica para la separación de proteínas del tejido nervioso. En aquellos casos que existen reportes, estos no describen un detallado estudio de las proteínas, sino más bien se enfocan a la posible alteración inducida por una manipulación específica (Deutch y col, 1980).

Otras investigaciones se han abocado al estudio de subpoblaciones de tejido neuronal. Ejemplos de esto son los estudios de Weil y McIlwain, 1981, que estudiaron las proteínas solubles de las motoneuronas espinales de bovino, o el estudio de Brown y col, 1981 los cuales estudiaron proteínas de los neurofilamentos del SNC tanto en rata como

en ratón.

Algunos investigadores han estudiado las proteínas del cerebro humano post-mortem y se han abocado a desarrollar un mapa o atlas de proteínas presentes en condiciones normales. (Comings, 1982; Comings y col, 1982; Kósik y col, 1982). Otros se han centralizado en las diferencias producidas por estados patológicos específicos. (Rosenberg y col, 1979; 1981). Sin embargo, una limitación inherente a estos estudios (y por lo tanto su limitado uso) es su variabilidad entre el tiempo de muerte y el momento del muestreo.

Quizás el primer intento en evaluar sistemáticamente los patrones protéicos (por medio de 2D-PAGE) de diferentes regiones anatómicas del cerebro de la rata macho en condiciones normales, se llevó a cabo en el año 1983, (Heydorn y col, 1983). Este grupo estudió los patrones protéicos de 25 diferentes áreas del cerebro de la rata macho, mapeó la localización y determinó las concentraciones relativas de diferentes proteínas visualizadas por el 2D-PAGE. Estos autores seleccionaron para la cuantificación 91 polipéptidos que cumplieron los siguientes criterios de selección:

- 1) Estar presente en concentración significativas en uno o más sitios anatómicos.
- 2) Tener una buena resolución para poder medir con mayor exactitud la densidad de la marca;
- 3) Representar un amplio rango en pesos moleculares y puntos isoeléctricos.

La mayoría de los polipéptidos seleccionados (53%) mostraron una variación (entre bajos y altos niveles

detectados) menor de 4 veces entre las concentraciones detectadas en los diferentes sitios anatómicos. En contraste a esto, aproximadamente un 10% de las proteínas examinadas tuvo una variación mayor de 10 veces entre las diferentes concentraciones para las regiones neuroanatómicas elegidas. Las proteínas elegidas fueron analizadas y clasificadas según su masa, carga y concentración relativa. Es interesante que la inspección del mejor 2D-PAGE mostró que más de 300 proteínas pueden ser visualizadas a través de este método. Sin embargo, este número es sólo una pequeña fracción del número de proteínas presentes en el cerebro de una rata, estimado en más de 100,000 (Bantle y Hahn, 1976; Chikaraishi, 1979) según el número de ARN_m mensajeros. Cabe mencionar sin embargo que este número al parecer no es real ya que en un reporte reciente, Duncan y McConkey, 1982 sugirieron que sólo un pequeño porcentaje de los ARN_m son traducidos.

Es evidente que manipulaciones químicas diferentes tales como, alteración del rango de pH en la electroforesis de una dimensión, cambios en la concentración de acrilamida en la de 2 dimensiones, o el fraccionamiento subcelular previo a la electroforesis para concentrar proteínas en mayor grado, posibilitarán la detección de un rango más amplio de proteínas. Además, refinando y mejorando la técnica de marcaje con plata que limita actualmente la selección de proteínas que se encuentran en concentraciones de por lo menos 20 pg/mm², posibilitará a futuro la detección de proteínas que se encuentran en concentraciones muy bajas.

Otra limitación que en este caso no se tomó en cuenta,

fue el número de ratas evaluadas por cada región. Además la hora del día en que estas evaluaciones se realizaron, representa un factor importante en la detección de un posible componente circadiano o ultradiano que modifique los patrones de proteínas de las diferentes regiones neuroanatómicas.

Otro punto que en este estudio no se menciona, es la diferencia entre proteínas estructurales y proteínas solubles. Al respecto, Kler y Rosen en 1985 estudiaron el patrón electroforético de proteínas solubles en 7 regiones anatómicas diferentes del cerebro de la rata. Sus datos mostraron que a pesar de que el número de bandas protéicas no cambió (36 bandas protéicas/región), si hubo una variación en la densidad relativa (en especial en el rango de pesos moleculares bajos) de estas proteínas, sugiriendo que no sólo la identidad de proteínas es importante sino que la cantidad o concentración proteica puede representar otro modo de regulación de funciones en el SNC.

El estudio de proteínas específicas del tejido nervioso solo recientemente esta recibiendo gran importancia. De hecho, estudios como los de Ambron, 1982, en el cual estudian las diferencias en la distribución de glicoproteínas específicas en regiones distintas de una neurona gigante de la aplisia o los de Kelly y Cotman, 1977, donde se intenta la identificación de proteínas y glicoproteínas de la membrana plasmática sináptica, de las uniones sinápticas y de las densidades postsinápticas, ejemplifican con absoluta claridad el interés por conocer, y en últimas circunstancias entender

la variedad de funciones que se asientan en estas moléculas. No sería raro que en años posteriores se confeccionaran mapas protéicos de las diferentes regiones del cerebro y tampoco sería extraño que sólo cuando se tenga construido el mapa protéico del tejido nervioso, podamos empezar a entender muchas de las tantas funciones, algunas conocidas y la mayor parte desconocidas del sistema nervioso.

C.- Proteínas Específicas del SNC.

El SNC lleva a cabo a través de su actividad una gran variedad de funciones, muchas de las cuales son específicas de este sistema. Funciones tales como la conducción del impulso nervioso, la transmisión sináptica o el establecimiento de conexiones específicas, son ejecutadas por las células nerviosas. Las proteínas, como componentes importantísimos de estas células, son en una gran medida responsables directos de la óptima realización de estas funciones específicas. Resulta por tanto altamente probable que estas funciones específicas del SNC y de las neuronas en particular, dependan de manera importante de proteínas específicas de este sistema.

Existen diferentes estrategias experimentales, las cuales pueden ser usadas para el estudio de proteínas que probablemente estén involucradas en funciones específicas del SNC.

Una estrategia a seguir es la de seleccionar proteínas

de ciertas estructuras subcelulares que es sabido que son importantes en el funcionamiento del SNC. Este sería el caso, por ejemplo al estudiar proteínas de la mielina, de los microtúbulos, de la membrana sináptica o de la vesícula sináptica. Otra estrategia sería estudiar alguna función importante del sistema, por ejemplo, el metabolismo de algún neurotransmisor y así estudiar las proteínas específicamente involucradas en esta vía metabólica. Otra forma de estudiar especificidad de estas moléculas es a través de un estudio sistemático de proteínas que, son por una parte específicas al SNC y además se encuentran en sistemas nerviosos de una gran variedad de especies. Esta estrategia lleva consigo la premisa de que proteínas que se han conservado durante la evolución y que no son requeridas en otros sistemas, tienen necesariamente una función específica importante en el SNC.

Para la realización experimental de esta estrategia es necesario en primera instancia preparar "mapas protéicos" ya sea de proteínas membranales o solubles y hacer la comparación de proteínas del SNC y otros órganos. Una vez que de manera visual se identifica alguna banda específica al SNC (en gels de poliacrilamida), se procede a preparar un antisuero en contra de esa banda. Debido a la sensibilidad y especificidad de diferentes métodos inmunológicos es posible evaluar la especificidad de esta proteína al SNC, su localización en un tipo celular específico, su "conducta" durante la ontogenia, e incluso su regulación metabólica en un cultivo de tejido o en un sistema sintético libre de células.

Durante los últimos años se han aislado y caracterizado una gran cantidad de proteínas específicas del tejido nervioso. Estos análisis se han realizado gracias al desarrollo de diferentes técnicas para el estudio de proteínas: electroforesis en geles de dos dimensiones o en geles de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS) y algunos métodos inmunoquímicos como microfijación del complemento y el radio-inmunoensayo han sido usados con mucho éxito. También el desarrollo de métodos inmunohistoquímicos han ayudado a conocer la localización anatómica de proteínas específicas del tejido nervioso. Los trabajos pioneros en este campo fueron sin duda los de Moore y McGregor en 1965, que llevaron al descubrimiento y aislación de dos proteínas específicas del cerebro de bovino (Moore y Pérez 1966). Estas dos proteínas fueron llamadas S-100 y 14-3-2 en base a sus características en el proceso de purificación.

En relación a la S-100 al igual que muchas otras proteínas específicas del sistema nervioso es importante mencionar que a pesar de que han pasado 20 años desde su descubrimiento aún su función no se ha podido determinar. Esto radica en el hecho de que hasta que no se le conozca su función biológica es muy difícil diseñar un buen experimento que ayude a dilucidar su papel fisiológico. Lo que es posible es correlacionar niveles de esta u otra proteína en diferentes condiciones tales como: enfermedades, reacción a diferentes fármacos, diferentes estados conductuales, etc. Incluso, aún en el caso de ser específica a un tipo de células, la

interpretación de los datos experimentales en términos de su papel fisiológico no es posible. Sin embargo y a pesar de lo mencionado, muchos estudios han implicado a la S-100 en procesos tan complejos como son memoria y aprendizaje. (Zomzely-Neurath y Keller, 1977; Hyden y Lange, 1970).

Un dato que tiene relevancia al presente estudio fue proporcionado por Shoshoua y Col, 1984 los cuales mostraron que esta proteína se libera al espacio extracelular y por lo tanto podría estar involucrada también en mecanismos de transferencia de información intercelular.

A pesar de que a la fecha existe un cuerpo de conocimientos bastante voluminoso en relación a diferentes propiedades de una gran cantidad de proteínas específicas del sistema nervioso (Bock, 1978) me limitaré a mencionar que apesar de que el desarrollo de este campo está aún en su fase preliminar, no resulta muy osado predecir que a medida de que se conozca con mayor precisión el funcionamiento de estas proteínas específicas, entenderemos de manera mas cabal el funcionamiento celular y obviamente la actividad del SNC.

Hasta este punto hemos visto algunas características de las proteínas del tejido nervioso, sin embargo, existen aún muchas preguntas interesantes en relación a este tema. Por ejemplo, Qué características tiene el contenido protéico de los fluidos del cerebro? Qué diferencias existen en el patrón protéico del líquido cefalorraquídeo (LCR) y el líquido extracelular (LEC)? Cuán distintos son estos patrones de la población protéica del plasma?

III.- PROTEINAS DEL LIQUIDO CEFALORAQUIDEO (LCR)

Las proteínas presentes en el LCR normal son en su mayoría derivadas del plasma a excepción de proteínas originadas en el cerebro y algunas γ -globulinas, las cuales son modificadas en el cerebro. El bajo contenido protéico del LCR en comparación con el plasma (35 vs 7000 mg/100 ml), sugiere la exclusión importante de macromoléculas por las barreras del LCR-Cerebro y sangre-LCR. Recientemente dos vías de transporte a nivel de epitelio de los plexos coroideos han sido postuladas: 1) A través de poros de 117 Å de radio que permitirían el paso de proteínas por difusión, ultrafiltración o ambas y 2) Vesículas pinocitóticas con 250 Å de radio que permitirían el intercambio de moléculas grandes (Rapoport, S.I., 1982).

Debido a que la concentración protéica en el LCR equivale a un aproximado .5 % de la del plasma, la velocidad de salida de proteínas es unas 200 veces mayor que la velocidad de entrada.

Proteínas tales como la prealbumina, albúmina, transferrina, globulinas alfa₁, alfa₂ y inmunoglobulinas A, G, M, glicoproteínas y fibrinógenos son encontradas normalmente en el LCR e identificadas por inmunoelectroforesis, (Fishman, 1980). Sin embargo las concentraciones son muy bajas en comparación con las concentraciones plasmáticas. Por ejemplo, la albúmina que en

plasma se encuentra en concentraciones de 36,000 mg/lit, en LCR su concentración es de 155 mg/lit, aproximadamente 250 veces menor que la del plasma. Es interesante mencionar que existe un gradiente ventrículo-espinal para la concentración de proteínas, este gradiente disminuye de lumbar (20-50 mg/100 ml) a cisternal (15-25 mg/100 ml) y a ventricular (6.12 mg/100 ml), (Weisner y Bernhardt, 1978).

La albúmina constituye de un 56 a un 76% de la proteína total del LCR y representa un 52 a un 67% de la proteína total de suero (Schultze y Heremans, 1966). El contenido normal de la proteína β -trazadora, que equivale a un 7% del total protéico de LCR, se encuentra prácticamente ausente en plasma, hecho que sugiere que esta proteína tiene un origen central (Link y Olsson, 1972).

Otro hecho importante es que durante el desarrollo ontogenético existen cambios en relación a la concentración de proteínas del LCR. Las concentraciones de los trazadores protéicos- β y las microglobulinas- α_2 son más de dos a tres veces mayores en neonatos que en adultos. Por otro lado los niveles absolutos de IgG, IgA e IgM así como proteína total del LCR se correlaciona positivamente con la edad, (Kobotake y col, 1980).

A pesar de que la concentración de albúmina es menor en mujeres, la proporción para albúmina LCR/plasma es la misma para ambos sexos, lo que sugiere que en individuos normales existe un equilibrio dinámico entre proteínas del LCR y del plasma, (Ahonen y col, 1978).

En relación a enzimas, normalmente la actividad de la mayoría de enzimas es menor en LCR que en sangre, sin embargo existe una serie de enzimas que se encuentran en el LCR en condiciones normales, las cuales presentan actividad nada despreciable. Actividad alta de ciertas enzimas es por general reflejo de lesión celular o actividad del tejido nervioso. Por ejemplo, la enzima láctico deshidrogenasa (LDH, E.C. 1.1.1.27) ha sido ampliamente usada como marcador de daño celular central. También la creatinina fosfoquinasa (CPK, E.C. 2.7.3.2) se ha usado con este mismo objetivo y la isoenzima cerebral (BB) ha sido detectada en CSF pero no en plasma (Sherwin, y col., 1969).

Otras enzimas que participan en el metabolismo de neurotransmisores también aparecen en el LCR. Por ejemplo, la colinacetyltransferasa (CHAT, E.C. 2.3.1.6) encontrada en el LCR es mayor que la del plasma, pero menor que la del cerebro, lo cual podría ser reflejo de actividad colinérgica o consecuencia de degeneración neuronal. (Aquilonius y Eckernas, 1976). Acetilcolinesterasa (AChE, E.C. 3.1.1.7), la enzima que cataboliza ACh, está presente en el cerebro en dos formas, unida a la membrana y soluble. Los niveles de actividad de colinesterasa (ChE) y de acetilcolinesterasa (AChE) en LCR son 13 y 16 veces mayores respectivamente que en plasma. La acetilcolinesterasa, que se libera al LCR por estimulación eléctrica o farmacológica del cerebro, corresponde a un tipo específico de isoenzima (isoenzima V) lo que sugiere que el aumento de AChE en el LCR es consecuencia de la actividad de neuronas centrales más que

reflejo de un daño del tejido o transferencia de la enzima plasmática. (Este punto se tratará con mayor detalle más adelante).

Otra enzima, la dopamina- β -hidroxilasa (DBH E.C. 1.14.2.1) que cataliza la formación de norepinefrina a partir de dopamina también se encuentra en LCR y resulta dudoso que su origen sea plasmático ya que la actividad específica de la DBH en el LCR es 25 veces mayor que la del plasma. Así, otra vez al igual que con AChE, la actividad de la DBH en LCR parece reflejar o ser indicio de actividad noradrenérgica central. Otras enzimas, la catecol-o-metiltransferasa (COMT, E.C. 2.1.1.6) y la indolamina-n-metiltransferasa (INMT, E.C. 2.1.1.27a) involucradas en el catabolismo de catecolaminas e indolaminas han sido también detectadas en el LCR de animales y humanos (Narasimhachari y Lin, 1975).

IV.- PROTEINAS DEL LIQUIDO EXTRACELULAR (LEC)

El LEC se encuentra en el espacio extracelular (que representa un 20% del volumen total del tejido) y es sin duda el sustrato donde no sólo se lleva a cabo la comunicación celular del sistema nervioso sino que es además la vía por la cual diferentes fármacos modifican estas funciones.

Ya que este fluido es el sitio donde ocurren diferentes eventos bioquímicos involucrados en la transmisión de información nerviosa, resulta importante conocer el papel de moléculas proteicas de este proceso.

Diferentes trabajos tanto en preparaciones in-vitro como in-vivo han mostrado que la liberación de proteínas al líquido extracelular puede tener un papel muy importante en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso.

Es evidente que el paso fundamental para evaluar la(s) posible(s) función(es) de estas proteínas en el SNC sería la identificación, aislamiento y caracterización de las mismas.

Con tales fines Hofstein y col., 1983, desarrollaron un procedimiento de extracción del LEC y posteriormente caracterizaron de manera preliminar estas proteínas. El procedimiento consistió en incubar cerebros perfundidos intactos en un medio isotónico, por más de dos horas a 0°C con el propósito de permitir la liberación del LEC al medio, sin destruir la integridad del tejido. La validéz de esta

metodología se estableció por: a) El hecho de que el total de proteínas del LEC fue constante por unidad de peso del tejido nervioso. b) Ausencia de tirosina hidroxilasa de los extractos (enzima usada como marcador de fracción citoplasmática y por ende como marcador de lesión); y c) Las diferencias entre los patrones electroforéticos de una y dos dimensiones de estas proteínas con los de la fracción citoplasmática y la fracción membranar.

Los resultados mostraron que el LEC contiene una mezcla amplia de proteínas con un rango de pesos moleculares (PM) de 10,000 - 100,000 daltons a un nivel de concentración de .3% en el LEC. La cantidad de proteínas extraídas aumentó proporcionalmente hasta dos horas de incubación, momento en que se llegó a un "plateau". Al cabo de este tiempo, en un volumen total de 70 μ l de LEC extraído, se obtuvieron 200 μ g de proteína que equivale a .05% del peso húmedo del tejido. La cantidad de proteína extraída fue de 2.8×10^{-3} grs/ml de tejido, correspondiendo a .3% del total protéico del tejido. Ahora, si se hace la corrección por volumen de los espacios ventriculares, (que corresponde aproximadamente a un 50% del espacio extracelular), implicaría que este valor llegaría a un .6%.

Se obtuvieron aproximadamente 70 μ l de LEC que equivaldría a un estimado del espacio extracelular igual a un $20 \pm 5\%$ del volumen total del cerebro. La cantidad de proteínas citoplasmáticas de los mismos cerebros fue de 4.5 mg de proteína por cerebro que equivale a un 10% del contenido protéico del cerebro. A través del análisis de los

patrones electroforéticos se observó que existen dos bandas prominentes a 68,000 y 55,000 daltons. Cuando se compararon los patrones de una y dos dimensiones de la fracción citoplasmática con la fracción del LEC se comprobó que las bandas de LEC son exclusivas de esa fracción y no aparecen en el patrón de bandas de la fracción citoplasmática.

Si se asume que el contenido de proteínas en el líquido céfaloraquídeo es igual a un .6% (después de la corrección por volumen), implicaría que la proporción protéica LEC/LCR es igual a 20/1 lo que sugiere que debe existir un gradiente de concentración protéica entre LEC y LCR.

Finalmente quisiera mencionar que en un reciente reporte (Shashoua y Holmquist, 1986), se han mostrado evidencias que señalan la presencia de proteasas y esterases en el LEC de ratones. Como podemos apreciar ya se han empezado a identificar algunas de las posibles funciones de las proteínas del LEC.

V.- SINTESIS DE PROTEINAS CEREBRALES

A.-GENERALIDADES

El esquema general de la síntesis proteica que también incluye la síntesis proteica cerebral, ha sido ampliamente estudiado. (Nirenberg, 1970).

El material genético (ADN) dirige fundamentalmente la síntesis de tres clases de ácidos ribonucleicos (ARN): 1- ARNt, que une específicamente un solo aminoácido y lo lleva al complejo de síntesis proteica. 2- ARNm, cuya secuencia de nucleótidos dirige la inserción de aminoácidos en la cadena polipeptídica en crecimiento. 3- ARNr, que unido a proteínas ribosomales forma los ribosomas que tienen la capacidad de "aglutinar" todo el complejo de síntesis proteica.

La síntesis proteica cerebral, se realiza fundamentalmente en polisomas (grupos de ribosomas unidos por cadenas de ARNm) unido al Reticulo Endoplásmico. (el camino intracelular que llevan proteínas secretoras posterior a su síntesis se discutirá mas adelante).

El estudio de la síntesis de proteínas cerebrales ha presentado, como ha ocurrido en muchas de las otras áreas de la investigación biológica, una lucha constante con problemas metodológicos. Debido a esto, muchos laboratorios han tratado de encontrar "el mejor" método para medir la síntesis de proteínas cerebrales.

Antes de discutir en breve el problema metodológico, creo conveniente mencionar que el metabolismo proteico incluye la síntesis y la degradación de las mismas. Estos dos procesos están muy relacionados el uno con el otro y representan el "recambio proteico". En la actualidad se habla de recambio haciendo mención al término $t_{1/2}$ (tiempo de vida media) que representa exactamente el tiempo en el cual la mitad de la proteína es usada o consumida. Esto se menciona porque diferentes autores que estudian la síntesis de proteínas, se refieren a la síntesis, otros al recambio y otros (los menos) a la degradación de proteínas cerebrales.

B. - MÉTODOS PARA LA MEDICIÓN DE SÍNTESIS PROTEICA.

Distintas preparaciones in-vitro (que son fácilmente controlables) y también los llamados estudios in-vivo (que son más difíciles de controlar), han sido usados en el estudio de la síntesis proteica cerebral.

1.- Estudios in-vitro:

Sistemas in-vitro han sido usados por varios investigadores para estudios de la síntesis proteica cerebral, fundamentalmente debido a las facilidades que ofrece en el control de las condiciones experimentales. Sin embargo los resultados de muchas investigaciones han mostrado que estos sistemas no reflejan fielmente, lo que

realmente ocurre en el sistema in-vivo. Por ejemplo, estudios con rebanadas de tejido cerebral inmaduro, mostraron que la incorporación de un precursor radioactivo fue solo un 80% de los valores obtenidos in-vivo. Aún mas dramáticos fueron los resultados con tejido adulto, donde la incorporación in-vitro alcanzó solo un 10% de lo obtenido en el sistema in vivo. (Dunlop y col, 1977). Ya que otros sistemas in-vitro presentan una problemática similar a los mostrados en rebanadas de tejido, los modelos in-vitro practicamente se pueden descartar como sistemas para el estudio fisiológico de la síntesis proteica cerebral.

2.- Estudios in-vivo.

Lo que primero hay que mencionar en relación a estos estudios es que en realidad no son estudios completos in-vivo, sino que consisten en una combinación de una parte in-vivo, que generalmente corresponde a la administración del trazador o precursor radioactivo aunado a su periodo de incorporación, mas una parte analítica que requiere sacrificar al animal experimental.

Uno de los problemas más estudiados, ha sido el referente a la actividad específica (AE) del precursor. La actividad específica de un compuesto radioactivo se refiere a la cantidad de radioactividad (DPM, CPM, uCi, etc) contenida en una unidad de masa del elemento (grs, mM, etc)

Los cambios en la AE del precursor reflejaran evidentemente cambios en los patrones de síntesis y por lo tanto se han desarrollado algunos métodos con el objeto de tratar de mantener constante la AE del precursor.

Los primeros experimentos que se realizaron para estimar la síntesis proteica cerebral in-vivo, utilizaron como medición la incorporación de la radioactividad a proteínas, posterior a la administración de un aminoácido marcado radioactivamente siendo la Lisina, Leucina y Metionina los mas usados. Estos estudios han mostrado que los $t_{1/2}$ de proteínas cerebrales varían en un rango de 2-20 días. Desgraciadamente estos estudios evidenciaron que mientras mas largos los experimentos, (tiempos mayores de incorporación del trazador) mas largos resultaban los $t_{1/2}$ y a su vez, experimentos cortos resultaban en $t_{1/2}$ cortos. A pesar de que algunos investigadores atribuyeron este efecto a la heterogeneidad de las proteínas cerebrales, Clouet y Richter, 1959 inyectando ^{35}S -MET por via cisternal o subaracnoidal obtuvieron $t_{1/2}$ similares a diferentes tiempos después de la inyección. Estos resultados controversiales llevaron a entender la necesidad de conocer mejor la fuente del precursor y su AE, ya que alteraciones en estos parametros parecían ser la causa de estas variaciones.

Garlich y Marshall, 1971 hicieron el primer intento por resolver este problema y administraron por via venosa de manera continua L-(U- ^{14}C)TYR (1 $\mu\text{Ci/hr}$, .08 $\mu\text{mol/hr}$, en 250

ul) durante dos horas. La idea de este experimento fue llegar a obtener de manera rápida una AE constante del precursor y así estimar la síntesis proteica por mediciones de la AE del aminoácido al final del periodo de infusión. Para esto ellos asumieron que la AE del precursor no difiere apreciablemente del total del aminoácido libre cuya poza se asume es homogénea. Con este método, encontraron que el $t_{1/2}$ promedio de proteínas cerebrales era aproximadamente de 4.3 días.

Dunlop y col, 1975 usaron una variación del método recién descrito, inyectando i.p. grandes cantidades del precursor radioactivo (10-15 $\mu\text{mol/grs}$ de tejido de L-(14C-Val)) lo que resultó en una AE relativamente constante por lo menos por dos horas. Estos autores mostraron que a estas concentraciones no se inhibía la síntesis proteica cerebral y además que toda la radioactividad se mantiene en Valina incluso despues de varias horas. Con este procedimiento se logró una AE del precursor en el cerebro de 80-90% de la inyectada y lo importante fué que la incorporación del precursor a proteínas fué lineal durante 2-3 horas posterior a la inyección. Las ventajas de este método incluyen: inyección de un pulso único; se puede aplicar al estudio de recién nacidos; no produce inhibición de síntesis proteica y se evita el problema de "compartamentalización".

Chee y Dahl, 1977 usaron otro tipo de precursor (1 mCi de 14C-NaCO₃) administrado i.p. y lo compararon con la administración i.v. de 14C-Tyr. Se encontraron dos poblaciones distintas de proteínas, una con un $t_{1/2}$ de 4 horas y la otra con un $t_{1/2}$ de 12 horas. Los autores aluden

que el precursor usado tiene la ventaja de minimizar el problema de reciclaje de la marca radioactiva, problema que tienen los aminoácidos esenciales. Los t_{1/2} encontrados con este precursor fueron la mitad de los obtenidos con aminoácidos esenciales.

En 1978, estos mismos autores (Chee y Dahl , 1978) extendieron sus estudios y mostraron que usando ¹⁴C(NaCO₃) como precursor, se obtuvieron velocidades de degradación de proteínas cerebrales dos veces mas rápidas que usando (4,5-³H)-Leu o (1-¹⁴C)-Leu como precursor. Además encontraron que el recambio de proteínas fue de 3-4 veces mas rápido que usando Lisina o Leucina como precursor. Aún mas, analizando el t_{1/2} de proteínas de diferentes fracciones subcelulares, en todas ellas se obtuvieron t_{1/2} mas cortos. Otra vez la explicación a este fenómeno la basan en el problema de reutilización.

En 1978, Reith y col usaron el método de Dunlop y col, 1975 inyectando grandes cantidades de Valina en ratas jóvenes y adultas, normales e hipofisectomizadas. Estos autores mostraron que en esencia este método es bueno y que también se refleja en la disminuida síntesis proteica en ratas hipofisectomizadas. Sin embargo mostraron que además existe una importante desventaja. La inyección de soluciones hipertónicas, produce una salida de agua de la sangre que produce consecuencias nocivas en el equilibrio de líquidos del organismo. Una hora después de la inyección gruesa del precursor, el contenido proteico del plasma, fue

significativamente más elevado que en animales controlados sin inyectar. Aún más, al analizar los niveles plasmáticos de corticosterona, observaron que éstos eran equivalentes a los encontrados por exposición del animal durante cinco minutos al éter.

Dwyer y col, 1982 desarrollaron un nuevo método en el cual combinaron la inyección i.p. de grandes cantidades del aminoácido precursor de AE baja con la cuantificación radioautográfica. Las ventajas de este método según los autores son: 1- permite estudiar este fenómeno en animales jóvenes o recién nacidos y en animales en libre movimiento. 2- se omite el stress de la anestesia y cirugía. 3- Al usarse 150 mM de Valina (que es isotónica) no se producen los problemas de equilibrio osmótico. 4- Permite el uso de un estándar interno para la radioautografía con lo cual la incorporación de Valina se mide directamente.

Como hemos podido apreciar los problemas metodológicos en la medición de la síntesis proteica cerebral son varios. Sin embargo los resultados del recambio proteico cerebral, obtenidos en distintos laboratorios no son muy diferentes, resultando un promedio para proteínas cerebrales de la rata y el ratón de un 0.6-0.7% / hora. Si todas las proteínas tuvieran esta velocidad de recambio implicaría que el $t_{1/2}$ estaría por debajo de los cuatro días.

Los estudios del grupo de Lajtha y col han estudiado extensamente este problema y en 1979 mostraron que en el tejido nervioso existen dos compartimentos proteicos diferentes: uno pequeño (3.5%) metabólicamente más activo con

un $t_{1/2}$ promedio de 10 hrs y otro grande (96%) menos activo con un $t_{1/2}$ de 10 días. A pesar de que se pueden estructurar estos dos grupos de proteínas cerebrales, diferentes evidencias sugieren que esta es mas que nada una división artificial. Por ejemplo Goridis y Neff, 1971 mostraron que la MAO en el cerebelo tiene un $t_{1/2}$ de 11 días en cambio la MAO del ganglio cervical superior tiene un $t_{1/2}$ de 4 días. Con esto se demuestra no solo que existen grandes variaciones en los $t_{1/2}$ de varias proteínas sino que las variaciones se dan incluso para una misma proteína en distintos sitios anatómicos.

C.-LOCALIZACION DE LA SINTESIS.

1.- SOMA CELULAR

Weiss y Hiscoe, 1948 no solo fueron los pioneros en dar evidencias experimentales sobre la existencia del transporte axonal, sino que además fueron ellos los que sugirieron también, que la síntesis proteica se llevaría a cabo en el soma y el transporte axonal se encargaría de destinarlas a las distintas regiones del axón. Sin embargo fueron Broz y Leblond, 1962; 1963 los que usando amino ácidos marcados radioactivamente y radioautografía mostraron claramente que posterior a la inyección del precursor, la marca aparecía en

un principio sólo en el soma y al cabo de un tiempo ésta empezaba a aparecer en el axón. Esta fué en el fondo la primera demostración de transporte axonal de proteínas recién sintetizadas. El contraste entre la marca densa aparecida en el soma con la ausencia de marca en el axolema, sugería fuertemente que la maquinaria sintética se encontraba sola o principalmente en el soma neuronal.

En 1955 Palay y Palade mostraron que la citología neuronal también daba crédito al soma, como sitio principal de síntesis proteica. El desarrollado Reticulo Endoplásmico Rugoso (RER) y el gran número de poliribosomas eran una clara expresión de este hecho. Además en este estudio se logró demostrar que en dendritas, pero no en axones existían cantidades apreciables de ribosomas.

Young y Droz en 1968 estudiaron la secuencia de aparición de la marca radioactiva y mostraron que al cabo de 5 minutos posterior a la inyección intraventricular de ^3H -Leu, la marca aparece en el RER, al cabo de 20-30 min la marca empieza a verse en el aparato de Golgi y entre los 30-90 min la marca radioactiva se observa en el axón en un gradiente somatofugal.

Como hemos visto, la ausencia de ribosomas (por lo menos a la luz de la microscopía electrónica) en el axón, sugiere fuertemente que la síntesis proteica se realiza en el soma y es el mecanismo de transporte axonal el encargado de surtir con material proteico al axón. Por tanto hoy existe el concepto de que el axón fuera de llevar a cabo síntesis de proteínas mitocondriales y membranales, deja todo el

abastecimiento proteico ribosomal en "manos" del soma celular.

Quisiera mencionar sin embargo que (y como se discutirá mas adelante con mas detalle) existen evidencias que señalan no solo que células gliales son capaces de abastecer con proteínas al axón, sino que además la transferencia intercelular de proteínas puede representar otra fuente de proteínas, quizás con un componente cualitativo fundamental para el axón.

2.- AXON

Edstrom, 1966 trabajando con el axón gigante de la neurona de Mauthner, al cual se le puede aislar con facilidad de su capa mielinica, y usando autoradiografía, dió las primeras evidencias de incorporación de amino acidos en proteínas axonales. Koenig, 1967 el cual obtuvo resultados similares usando el axón gigante del calamar, ha sido sin duda alguna el principal investigador de la síntesis proteica axonal. Este investigador ha atacado este problema en tres diferentes direcciones. 1.- el efecto que produce el daño del nervio a la síntesis proteica cerebral. 2.- estudios de síntesis de proteínas en cultivos de axones en regeneración libres de células gliales y 3.- la identificación de polipéptidos marcados en axones.

Tobias y Koenig, 1975 a,b mostraron evidencias de que la neurotomía, produce un aumento transitorio tanto de proteínas como de incorporación de ³H-Leu a proteínas axonales en un gradiente anatómico cuyo punto máximo se encuentra en la región mas cercana al sitio dañado. Por otro lado la identificación de polipéptidos del axón ha mostrado principalmente la existencia de alfa y beta tubulinas, actina, fodrina y dos proteínas de neurofilamento, la 200 K y 150 K. Todas estas proteínas fueron sensibles al tratamiento con el inhibidor de la síntesis proteica Cicloheximida. Posteriormente Koenig y Adams, 1982 mostraron que axones dañados incorporan amino-ácidos marcados fundamentalmente a beta-tubulina y actina. Otra vez, este proceso fue sensible a Cicloheximida pero no a Cloramfenicol.

Así, los estudios de Koenig y col parecieran sugerir fuertemente que sí existe una maquinaria de síntesis proteica axonal, pero cuya velocidad de síntesis parece ser bastante menor que la clásica ribosomal. Este hecho que no sorprende ya que evidentemente los requerimientos proteicos del soma y los del axón no tienen porque ser iguales.

En base a los efectos producidos por inhibidores de síntesis proteica, pareciera que la síntesis axonal no dista mucho de la síntesis ribosomal. Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, no hay evidencias que señalen la existencia de estructuras ribosomales en el axón, lo que mantiene una interrogante aún no resuelta. La identificación de las proteínas de síntesis axonal sugiere que esta síntesis local tendría como propósito servir como un suplemento a los

polipéptidos abastecidos por el soma a través del sistema de transporte lento. En base a esto pareciera que si las proteínas sintetizadas por el axón tiene una función determinada, esta sería la de proveer de elementos estructurales al axón, y no de elementos de exportación (liberables) que al parecer se originan exclusivamente en el soma celular.

3.- MITOCONDRIAS Y MEMBRANAS SINAPTICAS

Está bien evidenciado que las mitocondrias sinápticas también pueden sintetizar proteínas (Deamin y Gordon,1973; Ramirez y col ,1972) y pueden llegar a ser responsables de un aproximado 20 % de la incorporación local de amino-acidos marcados , detectados en la terminal sináptica (Gambetti y col,1972). A pesar de que membranas sinápticas también poseen la capacidad de síntesis proteica, resultados de Droz,1973 muestran que menos del 2 % del total proteico de la terminal sináptica,tendría su origen en la maquinaria sintético local de esta región.

De esta forma la síntesis de proteínas de origen mitocondrial en neuronas y glia así como en membranas axonales y sinápticas podría tener un papel cualitativamente importante pero nuestro conocimiento al respecto está aún en una fase muy preliminar.

VI.- CAMINO INTRACELULAR DE PROTEINAS LIBERABLES.

De acuerdo a los estudios de Palade, 1975 en células exócrinas del páncreas, el proceso de secreción de proteínas de exportación se lleva a cabo en una cadena de eventos como sigue: síntesis --- segregación --- transporte intracelular --- concentración --- almacenamiento intracelular --- liberación.

Las proteínas que se exportan (que se liberan de la célula) se sintetizan en polisomas que están unidos a la membrana del Reticulo Endoplásmico Rugosa (RER). Posteriormente la segregación de las nuevas proteínas se lleva a cabo en el espacio cisternal del RER. Esta segregación es simplemente el resultado de un transporte vectorial de la cadena polipeptídica recién sintetizada desde la subunidad grande de ribosomas a través de la membrana del RER para llegar al espacio cisternal. Las evidencias existentes parecen indicar que enzimas, ya sean asociadas con la membrana o presentes en el espacio cisternal, son responsables entre otras de la formación de puentes de azufre y de la glicosilación proximal de la cadena. Este proceso resulta en una modificación de la estructura terciaria, lo que le dará quizás la especificidad para su futura función. El paso siguiente será el transporte del espacio cisternal del RER hacia el complejo de Golgi. Experimentos con células

exócrinas pancreáticas del cobayo muestran que las proteínas de secreción en el RER se ubican en unas estructuras llamadas "elementos de transición" del mismo RER y de ahí pasan a unas vesículas periféricas pequeñas en el lado CIS del complejo Golgi. (El complejo Golgi está constituido por dos organelos unidos, el CIS y el TRANS, los cuales actúan secuencialmente para purificar y separar proteínas de exportación (liberables) de las proteínas del RE por un proceso llamado "destilación fraccional" (Rothman, 1981)). Posteriormente, las proteínas de exportación se internan en las llamadas vacuolas de condensación. Es interesante que este transporte intracelular es un proceso que requiere energía, ya que sin ATP, el producto secretable se queda en el RER y no sigue su curso normal. Aunque aún existen debates sobre la forma de comunicación entre el RER y el aparato de Golgi (comunicación permanente a través de túbulos continuos y comunicación intermitente a través de vesículas) la secuencia que lleva el producto secretor de un elemento al otro está bien demostrada.

El paso siguiente es la concentración del producto secretor en la vacuola de condensación hasta llegar a un nivel comparable al encontrado en los gránulos maduros de secreción. Este proceso, aunque al parecer no es dependiente de energía, si es muy sensible a variaciones de pH, lo que ha llevado a postular la participación de una bomba iónica localizada en la membrana de las vacuolas que al parecer regula este proceso. Es importante mencionar que la

ubicación de los sitios de concentración dentro del aparato de Golgi, difiere no sólo en diferentes especies y tipos celulares, sino que además es dependiente de las condiciones fisiológicas de la estructura en cuestión.

Aunque sí se sabe que la glicosilación final del producto secretor se lleva a cabo en el aparato de Golgi y que también existe proteólisis parcial por lo menos para algunas proteínas, el entendimiento funcional de este sistema y de sus mayores componentes estructurales, es aún rudimentario.

Las proteínas secretoras se almacenan temporalmente dentro de las células en los gránulos de secreción que no son otra cosa que vacuolas de condensación, las cuales han llegado al final del proceso de concentración. El mecanismo de secreción del contenido de los gránulos que ha sido muy estudiado, se lleva a cabo a través del proceso conocido como "exocitosis" (que originalmente se llamó fusión de membranas). Este proceso que inicia el gránulo o vesícula secretora, con la fusión de su membrana con el plasmalema, se continúa en una progresiva eliminación de capas, lo cual llevará a la separación de las membranas en esta área de fusión. Esto resulta por tanto, en la continuidad entre el compartimento granular y el medio extracelular, concomitantemente con la continuidad de la membrana granular (vesicular) y el plasmalema, todo alrededor del orificio por el cual el contenido granular llega al lumen o medio extracelular. Este proceso tiene la virtud, por tanto, de descargar el producto secretor y a la vez mantener la barrera

de difusión entre el citosol y el medio extracelular.

Debido a que la especificidad de este proceso es muy alta (la membrana del gránulo se une solamente con la del plasmalema y en células exócrinas esta especificidad es incluso mayor, ya que esta fusión se lleva a cabo solo en el dominio apical o luminal del plasmalema), se ha sugerido que existen sitios de reconocimiento entre ambas membranas, similares en alguna medida a los existente entre una hormona y su receptor membranal.

Los requerimientos del ion Ca^{++} y energía para este proceso están bien establecidos.

Por otro lado, es interesante mencionar que este proceso de secreción es independiente de la síntesis protéica.

A pesar de que el proceso usado por la célula para recuperar y redistribuir las membranas después de la exocitosis no está totalmente conocido, la recuperación de membranas en forma de vesículas endocitóticas y posteriormente el camino de regreso hacia al aparato de Golgi ha sido claramente observado en células pituitarias (Pelletier, 1974).

Esta ha sido una breve descripción de los pasos que lleva el producto secretor protéico de células exócrinas pancreáticas desde su síntesis hasta su liberación. Más adelante veremos que el producto protéico secretor en células nerviosas presenta algunas diferencias, sin embargo su estructura básica es muy similar a la ya mencionada.

VII.- TRANSPORTE AXONAL.

A.- GENERALIDADES.

La idea de que el soma celular es el lugar de síntesis de proteínas y otras moléculas necesarias para la célula incluyendo el axón, nos obliga al igual que en muchas otras ocasiones referirnos a Cajal.

En 1928, Cajal invocó la idea de que el soma produce sustancias tróficas las cuales son importantes para el mantenimiento del axón y de sus terminales sinápticas. Sin embargo, el concepto de flujo axoplasmático tomó forma solo cuando los experimentos clásicos de Weiss y Hiscoe, 1948 fueron realizados.

Estos experimentos mostraron que la constricción del axón hace que se acumule axoplasma en regiones próximas y no distales del sitio de constricción. Cuando esta constricción fue removida, el material acumulado se siguió hacia las terminales nerviosas a una velocidad de 1-2 mm/día. Así, el flujo axoplasmático fue demostrado y su velocidad establecida. A partir de estos experimentos no hubo grandes aportaciones al desarrollo del concepto como por 15 años.

Fueron Droz y Leblond, 1962, los que usando la técnica de autorradiografía de alta resolución, dieron a esta área

un importante impetu renovador. Estos autores demostraron de manera muy directa que cuando un aminoácido marcado con tritio, se inyecta sistémicamente en ratas adultas, éste se incorpora a células nerviosas y a proteínas que se mueven por los axones del nervio siático a una velocidad de 1 mm/día. Además la existencia de diferentes velocidades de flujo del movimiento en dirección opuesta (retrógrado) hacen evidente que el término "flujo axoplasmático" que sugiere un movimiento pasivo del axoplasma deja de ser correcto. El término "transporte axonal" parece ser mejor ya que implica por un lado que el axoplasma está involucrado en él y por otro que algún proceso más activo que un flujo, es lo que ocurre.

Hoy en día es claro que el transporte axonal contribuye no solo para el mantenimiento vegetativo de las células nerviosas sino que además las habilita para llevar a cabo sus funciones fisiológicas. Además ya se ha clarificado que este tipo de transporte no se confina únicamente al axón. Existen buenas evidencias que muestran que en las dendritas también se lleva a cabo un transporte "dendrítico" que no difiere mucho de lo observado en el axón. (Kreutzberg y Tóth, 1974).

B.- TRANSPORTE LENTO Y RÁPIDO

A pesar de que se han reportado evidencias que señalan a las células gliales como fuentes de origen de algunas proteínas del axón (Gainer y col, 1977; Lasek y col, 1977),

es sin embargo claro que la mayor fuente de proteínas axonales y terminales tienen su origen en el soma y el mecanismo del transporte axonal es el encargado de que estas proteínas lleguen a su destino.

La existencia de al menos dos distintas velocidades de transporte del material que viaja a través del axón han sido ya establecidos (Moewen y Grafein, 1968). La velocidad de transporte rápida la cual es llevada a cabo a 38 C, es de 240-400 mm/día. El transporte lento ocurre a una velocidad de flujo de 1-5 mm/día. (Heslop, 1975; Lasek, 1970). Otros estudios han reportado nuevas evidencias que muestran que el transporte a velocidades intermedias también existe. Por ejemplo Willard y col. 1974, mostraron evidencias de cuatro diferentes velocidades de transporte: 240, 34-38, 4-8 y 2-4 mm/día. Posteriormente estos mismos autores sugirieron la existencia de un quinto tipo de transporte a una velocidad aún más lenta que va de 0.7-1.1 mm/día.

Otros autores también han observado que el transporte lento no se lleva a cabo a una sola velocidad. Black y Lasek, 1977, reportaron que en el caso de la proteína actina y otras proteínas asociadas a esta, la velocidad de flujo es de 1-2 mm/día. En cambio para la tubulina y proteínas asociadas a neurofilamentos, la velocidad de transporte era de 0.5 mm/día. Todas éstas mediciones fueron realizadas en el sistema visual del cobayo.

El método mas popular para medir velocidades de transporte de distintos materiales a través del axón ha sido

el uso de trazadores radioactivos. Desgraciadamente con este método se puede perder importante información concerniente al movimiento individual de estas moléculas. Esto se debe a que esta técnica mide movimientos gruesos de grupos de moléculas. Forman y col en 1977, mostraron evidencias de microscopía, de materiales que se transportan a lo largo del axón, pueden parar, luego avazar, luego parar e incluso regresar retrogradamente. Por lo tanto este método no posibilita un estudio fino de este proceso.

Una nueva técnica para analizar velocidades de transporte de proteínas específicas ha sido desarrollada por Brimjoin en 1975. La técnica consiste en un enfriamiento localizado y reversible de regiones específicas del axón. De esta manera el transporte al llegar a este sitio se detiene y se acumula, y posteriormente al llevar la temperatura de esa región a su nivel anterior el material acumulado continúa su transporte normal. Evidencias experimentales con el uso de esta técnica apoyan la idea de que algunas enzimas individuales son transportadas a diferentes velocidades en el nervio. Tanto esta técnica de bloqueo reversible del transporte axonal por enfriamiento como diferentes estudios de microscopía de luz y electrónica sugieren que las velocidades de transporte son en general reflejo de la combinación de tiempos de movimientos y tiempos estacionarios o de descanso. De este modo, velocidades lentas de transporte serían reflejo de pequeños periodos en la fase de movimiento y largos periodos en la fase estacionaria. En todo caso es claro que se requieren mas evidencias experimentales para

dilucidar la naturaleza de los mecanismos responsables de las múltiples velocidades del transporte axonal. Finalmente vale recordar que los mecanismos de transporte axonal son altamente dependientes de la temperatura, (Cancalon, 1979).

VIII.- TRANSPORTE DENDRITICO

A pesar de que el transporte dendritico fue postulado por Droz y Leblond, 1963, la demostración experimental vino un poco posterior por Globus y Col, 1968; Lux y Col, 1970. La inyección intracelular de sustancias radioactivas aplicadas iontoforéticamente en el soma de motoneuronas espinales del gato, seguido de autoradiografía demostró la existencia de transporte de sustancias radioactivas en dendritas. Schubert y Kreutzberg, 1975 usando Glicina radioactiva mostraron transporte de proteínas marcadas en dendritas a una velocidad aproximada de 1 μ m/seg. En otras palabras, dentro de 15 a 20 minutos, proteínas recientemente sintetizadas pueden abarcar toda la arborización dendritica de una neurona motora. Sustancias transportables en dendritas incluyen materiales tan diversos como fucosilglicoproteinas, ácido mucopolisacárido, nucleótidos y ARN. Schubert y col, en 1972, mostraron que Colchicina que bloquea el transporte axonal también bloquea el transporte dendritico, sugiriendo que un sistema de microtúbulos es también la base del transporte dendritico. En un importante estudio de Kiss en

1977, usando autoradiografía en combinación con microscopía electrónica, mostró evidencias de que la síntesis de proteína se lleva a cabo fundamentalmente en la parte proximal de la dendrita y luego estas son transportadas a zonas más distales. Al parecer, al igual que en el transporte axonal, el transporte dendrítico se realizaría en dos fases: una rápida 100-200 mm/día y otra lenta con una velocidad de alrededor de 28-10 mm/día. Aún mas, en 1975, Lynch y Col. proporcionaron evidencias sobre la existencia de transporte bidireccional en dendritas de neuronas piramidales de la formación hipocámpal de la rata.

Como se puede apreciar, el transporte dendrítico comparte muchas de las características del transporte axonal. Quizás la mayor diferencia es la evidencia de ribosomas en arborizaciones dendríticas cerca del soma celular, lo que proporciona la maquinaria necesaria para la síntesis proteica. Como ya se mencionó, exceptuando algunas discrepancias (Koenig, 1985), en el axón no se encuentra la maquinaria de síntesis proteica y por tanto es el transporte axonal el que se encarga de abastecer de proteínas al axón y sus terminales.

En dos recientes estudios, Gorestein y col, 1985; Gorestein y Ribak, 1985 mostraron evidencias que indican que la presencia de microtubulos mantiene enzimas lisosomales en el soma celular pero que el tratamiento con colchicina, que inhibe la polimerización de microtubulos, "estimula" la traslocación o transporte de estas enzimas hacia las

dendritas.

Antes de profundizar en relación a la topogénesis proteica intracelular quisiera mencionar algunos puntos importantes en relación a la clasificación de células secretoras.

En 1978, Tartakoff y Vassalli clasificaron a las células secretoras en dos categorías: Constitutivas y Reguladoras. Las células constitutivas son aquellas que liberan el producto de secreción casi inmediatamente posterior a su síntesis y al parecer la mayoría de las células secretoras corresponden a esta categoría. Células del hígado, fibroblastos, células musculares y otras pertenecen a este grupo.

Las células reguladoras son aquellas que acumulan y mantienen una alta concentración del producto secretor (almacenado en vesículas o granulos secretores) listos para ser liberados en altas cantidades en respuesta a un estímulo apropiado. En la mayoría de estas células el material que está en las vesículas secretoras se condensa y permite ser visualizado en micrografías de microscopía electrónica por su apariencia de material opaco denso.

También las células pueden regular el sitio de secreción, como lo hacen las células neurosecretoras del hipotálamo. Este proceso se ha definido como Secreción Polarizada, en contraposición a como lo hacen los neutrófilos por ejemplo, los cuales secretan su producto en cualquier parte de la membrana plasmática, (Secreción No-Polarizada).

De esta manera, una célula secretora puede ser reguladora o constitutiva, polarizada o no-polarizada. De acuerdo con el autor, la secreción de proteínas en células constitutivas no involucra más que un mecanismo pasivo de flujo hacia la zona de secreción. En cambio, células reguladoras, las cuales también pueden poseer la vía constitutiva, requieren de un mecanismo de clasificación. La coexistencia en una célula de ambos modos de secreción, lleva indudablemente a la especulación de la posible coexistencia de secreción polarizada y no polarizada.

Es claro de acuerdo a esta clasificación, que la neurona representa una típica célula reguladora polarizada, ya que su secreción se lleva a cabo fundamentalmente a través de terminales axónicas. Sin embargo como ya discutimos, existen evidencias que indican también la existencia de liberación dendrítica. Aún no sabemos si la liberación dendrítica es una capacidad compartida por un grupo especial de células, o es un fenómeno generalizado que siempre ha existido, pero que por diversos motivos (quizás metodológicos, pero también probablemente conceptuales) no se ha estudiado en profundidad. Si este fenómeno resulta general, quizás estaríamos en presencia de células reguladoras con polaridad doble o células no polares. Evidentemente, lo que quisiéramos saber al respecto, es como la célula regularía estas dos vías de secreción, cómo la célula sabe a que vía mandar una proteína "x" y en definitiva si existen diferencias en los compuestos liberados por ambas vías.

IX.- TOPOGENESIS PRÓTEICA INTRACELULAR

Como vimos anteriormente, Palade en 1975 describió el camino intracelular que proteínas membranales o liberables llevan a cabo hasta llegar a su sitio final. Este conocimiento se ha obtenido gracias a la acumulación de evidencias que en principio utilizaron microscopía electrónica y el uso de marcadores radioactivos, y últimamente confirmado con el uso de anticuerpos o ligandos farmacológicos a proteínas específicas y además por la reconstitución de porciones de esta vía mediante estudios en sistemas in-vitro. Un hecho importante que queda aclarado gracias a estos estudios, es que proteínas membranales o secretoras se asocian a estructuras membranales, ya sea durante o inmediatamente posterior a su síntesis y esta asociación es mantenida durante toda su vida en la célula.

Evidencias de que una secuencia similar de eventos ocurre en las células nerviosas, fueron también obtenidas en principio por autoradiografía. Así, se observó que proteínas radioactivas pasan secuencialmente del RER al Aparato de Golgi y de ahí al axón, donde el proceso de transporte axonal rápido se encargaría de llevar estas proteínas hacia la terminal nerviosa. Cabe mencionar aquí, que además de las proteínas estructurales que se transportan por este proceso, enzimas membranales, fosfolípidos membranales, colesterol y gangliósidos, también son transportados de igual manera.

Debo recalcar también que el transporte de proteínas hacia el axón es un proceso no regulado o constitutivo, es decir, que ocurre de manera independiente de la actividad de la célula. Sin embargo, el transporte rápido es altamente dependiente del metabolismo oxidativo, (Ochs y Hollingsworth, 1971). (similar a la secreción de células plasmáticas y en contraposición a la secreción enzimática del páncreas exócrino, donde esto ocurre dependiente del estímulo).

Ahora bien, la célula parece poder distinguir los sitios donde deben ir las proteínas. A raíz de esto surge la pregunta: cuáles son los códigos moleculares que confieren a una proteína, un destino "x" y a otra un destino "y" ?. Eylar, en 1965 propuso que la adición de moléculas de azúcar era el principal mecanismo que confería destino a proteínas recién sintetizadas. A pesar de que existen algunos ejemplos que apoyan esta hipótesis, en los últimos 10 años se han revelado una serie de evidencias importantes que señalan que el destino de una determinada proteína se encuentra directamente codificado en una región específica de su cadena polipeptídica. Aún más, lo notable parece ser que algunas de estas regiones (referidas como "señales clasificadoras") empiezan a funcionar incluso antes de que la síntesis del polipéptido se haya terminado (Sabatini y col., 1982).

La existencia de estas regiones quedó demostrada cuando se estudió la síntesis de proteínas en sistemas de ARNm libres de células. Estos estudios mostraron que enzimas secretoras, hormonas y cadenas livianas de la inmunoglobulina aparecieron con un peso molecular mayor que cuando se

aislaron de células intactas. Para cada caso, la diferencia se observó en la región amino terminal de las proteínas que corresponde a los primeros 18-30 aminoácidos. Así nació la "hipótesis de la señal" (Blobel y Sabatini, 1971; Blobel y Dobberstein, 1975) y se propuso que esta secuencia servía en primera instancia para anclar el polisoma al RER. Posteriormente, y gracias a que contiene una preponderancia de aminoácidos hidrofóbicos, dirige el crecimiento de la cadena polipeptídica a través de la membrana hacia el lumen del RER.

La detección de esta secuencia "señal" en un sistema libre de células, se atribuyó posteriormente a la ausencia de una peptidasa específica (localizada en la cara que da al lumen de la membrana del RER) que normalmente corta esta región antes de que la cadena polipeptídica termine de sintetizarse totalmente. En la célula intacta, las proteínas secretoras recién sintetizadas, deben cruzar completamente la membrana, ya que se han encontrado libres en el lumen. Por tanto, topológicamente están ya fuera de la célula, secuestrada dentro de una estructura membranosa hasta la futura liberación vía exocitosis.

De lo anterior, resulta claro que proteínas secretoras y membranales, son segregadas de proteínas citoplasmáticas por mecanismos que están íntimamente ligados a su síntesis. En otras palabras, proteínas que nacen destinadas al transporte axonal, se agrupan junto con todas las proteínas membranales recién sintetizadas y proteínas secretoras, y este grupo se

constituye en el fondo como consecuencia de la inserción, señales de término y transferencia dentro de la misma cadena polipeptídica. Una vez que el transporte celular comienza, uno se pregunta: Cómo el sistema (célula) distingue entre proteínas migratorias (las que requieren ser transportadas a otras membranas) y sedentarias (las que se quedan en la membrana huésped) ? Una posibilidad es, como se ha mostrado en estudios de síntesis libres de células, que las proteínas se insertarían en la membrana del RE, de tal manera que imposibilitaría que la mayor parte de su cadena se oriente hacia el lumen. De esta manera pareciera que el reconocimiento de proteínas migratorias se llevaría a cabo cuando después de la inserción en la membrana del RE, "acarreadores" del lumen interactuarían con parte de la cadena expuesta a él. La peptidasa que remueve la "secuencia de señal" de la cadena polipeptídica naciente (Lively y Walsh, 1983) sería un ejemplo de enzimas que actúan en el lumen o sustratos orientados hacia el lumen. Quizás estas enzimas se quedan en el RE sólo por no ser reconocidas por los receptores de transporte intracelular. Como la secuencia de señal es insuficiente para especificar la ubicación última de la proteína, es posible que receptores sean los encargados de continuar con este proceso.

Ahora, para el caso de una célula polarizada como lo es la neurona, quizás la unión ocurra en la superficie luminal en vez de la citoplasmática. Esto resultaría en una importante ventaja, ya que así permitiría por ejemplo, que un factor trófico neuromuscular sea secretado de las terminales

nerviosas, no permitiendo de esta forma la secreción del mismo a través de dendritas de la neurona motora en la espina dorsal. Este proceso sería entonces, diferente a la secreción de células no polarizadas en que no es necesario una mayor reubicación para la secreción de proteínas lumenales. En concreto el mecanismo de reubicación de proteínas membranales del RE involucra, al menos tres distintas regiones de la cadena polipeptídica: 1) Una secuencia amino terminal que facilite la transferencia de la cadena polipeptídica nascente a través de la membrana; 2) Una secuencia de término de transferencia que fije la proteína en la membrana, definiendo su dominio luminal, intramembranal y citoplasmático; 3) Una secuencia reconocedora del receptor, en el dominio luminal de la proteína que especifique la transferencia fuera del RE.

Hoy existen interesantes evidencias que están ayudando a aclarar cada una de las etapas intracelulares que una proteína recién sintetizada sigue hasta llegar a su destino final. La segregación protéica en el aparato de Golgi, los mecanismos que le permiten a proteínas dejar este sitio y dirigirse al axón para su transporte por la vía axonal y últimamente los mecanismos de inserción (de la vesícula que la contiene) en la membrana plasmática, que permitirán o no una posible liberación de la célula, se están empezando a entender de manera sorprendente. Para mencionar alguno de estos avances, quiero referirme de manera breve a los "últimos" pasos que lleva el producto protéico hasta su

inserción en la membrana plasmática.

La existencia de "estructuras vesículo-tubulares" que llevarían a estas proteínas (proteínas de la terminal nerviosa) a través del axón está bastante bien documentada. (Tsukita y Ishikawa, 1980).

Existen distintas clases de estos organelos vesículo-tubulares y cada clase es guiado a una región distinta de la membrana plasmática como resultado de asociaciones con proteínas citoesqueléticas específicas. Ahora bien, en la membrana de estas vesículas existen los llamados receptores dobles, es decir, moléculas de ubicación transmembranal los cuales a través de su sitio de reconocimiento luminal unen a proteínas recién sintetizadas con un destino común y el sitio de reconocimiento citoplasmático será el que se unirá a los receptores de anclaje (que han llegado previamente a la membrana plasmática) y que gracias también a su ubicación transmembranal, permite que su cara citoplasmática reconozca y posteriormente una al receptor doble de las vesículas originados en el aparato de Golgi. (DeVillers-Thierby y col, 1983). Esta unión de anclaje (que probablemente se lleva a cabo gracias a interacciones iónicas) produce la iniciación de la fusión de ambas membranas (vesicular y plasmática) y que además resulta en un cambio en el pH intravesicular, lo que posibilita la disociación entre los receptores dobles y las proteínas recién sintetizadas. (Brown y col, 1983). De esta manera este proceso permitirá que estas proteínas se internalicen en la membrana presináptica (receptores), que se queden en el axolema o que se liberen de la célula.

X.- PROCESAMIENTO DE PROTEINAS EN TERMINALES SINAPTICAS.

La transmisión del impulso nervioso, el cual opera a través de la liberación del neurotransmisor, es una concatenación de eventos, muchos de los cuales a la fecha aún no han sido bien estudiados. Sin embargo existe la idea de que proteínas, bien sean enzimas involucradas en la síntesis, en el almacenaje o degradación del neurotransmisor, proteínas membranales de las vesículas sinápticas o de la membrana plasmática presináptica, juegan un importante papel en este proceso. Recientes progresos en técnicas de fraccionamiento celular y radiocautografías de alta resolución han hecho posible el demostrar que componentes protéicos y glicoprotéicos de la terminal nerviosa están bajo un continuo proceso de recambio para el cual el mecanismo de transporte axonal es fundamental. Es importante por tanto entender como la célula lleva a cabo este proceso de recambio protéico y cuáles son los mecanismos que posee para la realización de tal tarea.

A.- Degradación local.

Este mecanismo parece ser importante, ya que se ha encontrado una actividad de proteinasas considerable en sinaptosomas. En fracción cruda, el 45% de proteínas ácidas y el 15-50% de proteínas neutrales del encontrado en

homogenado de cerebro, se recupera en esta fracción de sinaptosomas y parecen estar asociados a lisosomas (Marks y Lajtha, 1975). A pesar de la aparente pequeña cantidad de lisosomas en la terminal sináptica (Gordon y col., 1968), una cantidad suficiente de enzimas proteolíticas e hidrolasas peptídicas que existen en la terminal nerviosa, parecen asegurar la degradación de una fracción importante de proteínas sinápticas a polipéptidos y/o a aminoácidos.

B.- Transporte axonal retrógrado rápido

En una preparación in-vitro que incluye al nervio hipogloso, Kristensson y col. en 1971 demostraron que proteínas exógenas eran tomadas por la terminal nerviosa y transportadas retrógradamente hacia el soma. Este sería otro mecanismo que posee la célula para hacer desaparecer proteínas, ya que una vez llegadas estas al soma, las enzimas lisosomales se encargarían de su hidrólisis. Es claro sin embargo, que aún queda mucho por avanzar en este campo como para llegar a entender cómo es que la célula sabe y decide mover una proteína x hacia el soma para su degradación.

C.- Proceso regenerativo

Es conocida la existencia de procesos regenerativos

espontáneos de las terminales sinápticas que se caracterizan por un alargamiento de las terminales nerviosas congestionadas con numerosos perfiles membranales, mitocondrias y lisosomas. Según Sotelo y Palay (1971), estos procesos son un reflejo de una regeneración continua de conexiones sinápticas. Sin embargo, queda por dilucidar hasta qué punto estos procesos regenerativos ocurren en el tejido nervioso sano, con qué frecuencia y si ésta es una característica de la dinámica del sistema nervioso central durante todo su desarrollo ontogenético o sólo es una característica del sistema en su fase adulta.

D.- Secreción de proteínas

No cabe duda de que este sería otro mecanismo que tendría la célula para deshacerse de proteínas sinápticas.

Además y como se verá más adelante, la liberación de proteínas ya sea por exocitosis o por un mecanismo alternativo de secreción, parece representar más bién un mecanismo de comunicación intercelular, más que uno de los procesos que posee la célula, para renovar su dote proteica en las terminales sinápticas.

Como este tema es central para esta tesis, se tratará más adelante de manera específica y con más profundidad.

E.- Renovación de Proteínas Sinápticas.

El ó los mecanismos de desaparición de proteínas sinápticas necesita rigurosamente acompañarse de estrategias que compensen esta pérdida de tal manera que la terminal nerviosa esté constantemente surtida con nuevas macromoléculas. Como ya se mencionó, varios estudios han confirmado que el sitio más importante para la síntesis protéica neuronal es el soma y que por medio del transporte axonal, proteínas son transportadas desde éste hacia el axón.

Las proteínas y glicoproteínas que irán a la terminal nerviosa serán transportadas en el axolema por el transporte axonal rápido a velocidades de 240-400 mm/día (Elam y Agranoff, 1971) y muchos otros.

La otra fracción que posiblemente no pasa al aparato de Golgi, participa en la elaboración de componentes axoplásmicos, incluyendo unidades para la formación de microtúbulos y filamentos. Estos componentes protéicos parecen emigrar del soma hacia el axón, a través de la vía lenta de transporte axonal y a velocidades de 1-5 mm/día (Feit y col., 1971).

En relación a proteínas mitocondriales, estas son transportadas por la vía lenta hacia la terminal sináptica. En el transcurso de la migración axonal, estos organelos, desprovistos de ribosomas citoplasmáticos pueden ser abastecidos por una pequeña cantidad de proteínas y

glicoproteínas transportadas rápidamente desde el soma. (Droz y col., 1973).

En resumen, proteínas y glicoproteínas que pasarán a formar parte de las vesículas o de membranas plasmáticas presinápticas son empacadas en el retículo endoplasmático liso y rápidamente dirigidas a la terminal por la vía de transporte axonal rápida (Hammershlag y col., 1962). Por otro lado, la mayoría de proteínas axoplásmicas, ya sean solubles en el hialoplasma o estructuradas como subunidades de microtúbulos y filamentos se transportarán por la vía de transporte lento.

Las mitocondrias bajarían por la vía lenta y renovarían por lo menos en parte su equipo protéico llegando a la terminal. Las proteínas mitocondriales corresponderían a enzimas transportadas rápidamente desde el soma y por síntesis protéica intramitocondrial para componentes membranales.

Cabe mencionar, que aunque al parecer no es muy importante desde el punto de vista cuantitativo, procesos tales como: 1) endocitosis de macromoléculas del espacio intracelular; 2) intercambio de moléculas polipeptídicas con células gliales; y 3) incorporación de aminoácidos a macromoléculas de la terminal nerviosa; podrían contribuir quizás cualitativamente a la renovación de proteínas sinápticas.

XI.- LIBERACION DE PROTEINAS

La liberación de neurotransmisores y los mecanismos que regulan su liberación han sido muy estudiados. La razón es obvia, son los efectores primarios del traspaso de información nerviosa.

Sin embargo, en los últimos años se han acumulado una serie de evidencias experimentales que sugieren que fuera de los neurotransmisores, existen otras sustancias también liberables de las células nerviosas. Entre estas sustancias, las proteínas y quizás en especial enzimas, son las que han abarcado el mayor interés para un grupo de neurocientíficos. La liberación de proteínas de células nerviosas ha sido reportado tanto usando sistemas in-vitro como sistemas in-vivo.

A.- LIBERACION DE PROTEINAS EN SISTEMAS IN-VITRO.

1.- Estudios en la Unión Neuromuscular.

La unión neuro-muscular ha sido una de las preparaciones in vitro más estudiadas con respecto a la liberación de proteínas de células nerviosas. Los trabajos a este respecto llevados a cabo por Musick y Hubbard, 1972, mostraron que la estimulación del nervio frénico produce la liberación de proteínas, que es dependiente de Ca^{++} pero independiente de

hecho de que el músculo este activo o paralizado con d-tubocurarina. Bray y Harris, 1975 mostraron que cuando las terminales nerviosas del nervio frénico se exponen a un medio con concentraciones altas de K^+ , la liberación de proteínas marcadas radioactivamente es evocada y que el bloqueo de la liberación de ACh (usando la toxina botulínica tipo-D) produce una acumulación de proteínas transportadas axonalmente, en o cerca de las terminales nerviosas del nervio frénico.

Como es sabido, y como se discutirá mas adelante la liberación de catecolaminas ya sea de células cromafines de la médula de la glándula adrenal o de las terminaciones noradrenérgicas, va acompañada por la liberación de proteínas solubles contenidas en vesículas noradrenérgicas, llamadas "cromograninas"

Las evidencias recién discutidas indican al parecer que también en terminales colinérgicas existiría una liberación de proteínas y que quizás también tengan un origen vesicular. Cabe recordar que Whittaker y col, en 1974, ya habían mostrado que las vesículas colinérgicas aparte de contener ACh y ATP, contenían una proteína soluble.

Más adelante, Nusick, 1979 continuó estudiando este fenómeno con mas profundidad. Usando la preparación de nervio frénico-hemidiafragma de la rata, este investigador mostró que la estimulación eléctrica del nervio paralizado con curare, produce una mayor liberación de material reactivo de LOWRY (MRL) en comparación con controles previos a la estimulación. Esta respuesta no se limitó al periodo de

estimulación sino que continuó durante 120 minutos posterior al estímulo. Musick mostró que esta respuesta es fundamentalmente dependiente de la frecuencia de estímulos más que de la duración de los mismos. Además constató la existencia de un nivel de saturación; por arriba de 3000 y hasta 6000 estímulos (5/seg) no hay un aumento real en la magnitud de la respuesta. Esta clase de estímulo que produce la liberación de MRL se correlaciona con la liberación de acetilcolina (ACh), siendo también dependiente de Ca^{++} y antagonizada por Mg^{++} .

Para determinar si la activación de la liberación de ACh se debía a factores distintos de la propagación de impulsos hacia las terminales nerviosas, administraron La^{+++} a la solución Ringer. Este compuesto tiene la propiedad de aumentar la frecuencia de PSM por arriba de 10000 veces sin afectar el potencial de membrana de las terminales nerviosas. Bajo estas condiciones, la liberación espontánea de ACh aumentó por lo menos unas 116 veces por sobre el valor control. También en estas condiciones los niveles de MRL liberados, fueron significativamente mayores que los del control.

Cuando los autores efectuaron cálculos para determinar el origen de este MRL, advirtieron que la gran parte de MRL liberado no proviene de producto de secreción de las vesículas sinápticas. La cantidad liberada excede (25-150 veces) el contenido de las vesículas sinápticas vertido por exocitosis. Musick discute en breve algunas posibles

explicaciones para determinar la magnitud del MRL liberado y concluye diciendo " que la liberación de Ach en la unión neuro-muscular se acompaña de la liberación de material proteico que no es derivado en su totalidad de las vesículas sinápticas."

Siguiendo con los estudios de liberación de proteínas en la preparación neuro-muscular, Younkin y col, en 1978, realizaron otro interesante estudio. El objetivo de este trabajo era demostrar la existencia de sustancias tróficas que afectan al músculo pero que son independientes de la actividad del nervio. Si estas sustancias existen, debieran cumplir las siguientes premisas de: 1. Estar presentes y moverse axonalmente en el nervio. 2. Estar presentes en el músculo inervado y ausente o en concentraciones muy reducidas en el músculo denervado y 3. Debieran además liberarse del nervio. Para tales objetivos usaron la preparación nervio siático-músculo extensor digitorum longus (EDL) y examinaron dos propiedades del músculo: la actividad de colinesterasa (Che) y la sensibilidad a acetilcolina (ACh), los cuales son dramáticamente influenciados por la innervación.

Para comprobar el transporte axonal, seccionaron los nervios siáticos de ambos lados de doce ratas, se tomaron segmentos del nervio control y cuatro días después de la sección se obtuvo de la zona proximal a la sección (lugar donde debieran concentrarse, si existen sustancias transportadas axonalmente) un segmento de 2.5 mm correspondiente al nervio "enriquecido". Al comparar el cultivo de músculos con segmentos del nervio control y

segmento de nervio enriquecido comprobaron que tanto la actividad Che como la sensibilidad a ACh fueron significativamente mayores en músculos cultivados con segmento "enriquecido". Para determinar si músculos inervados contienen sustancias tróficas que estarían ausentes o en bajas concentraciones en músculos denervados, cultivaron músculos EDL con extractos de músculos que fueron denervados por tres a siete días y los compararon con cultivos con músculos normalmente inervados. Otra vez la actividad Che y la sensibilidad a ACh de los músculos cultivados con extractos de músculos inervados fueron significativamente mayores comparados con músculos denervados. Por último para determinar si la estimulación del nervio libera estas sustancias (putativas) tróficas, compararon la actividad de colinesterasa de músculos cultivados con medio de cultivo proveniente de una preparación donde el nervio fué estimulado eléctricamente (7 Hz/30-60 seg) con la de un nervio sin estimulación. También en esta oportunidad la actividad de colinesterasa aumentó significativamente por las sustancias liberadas al medio de cultivo producto de la estimulación. Además comprobaron que un bloqueo postsináptico de la transmisión neuro-muscular con D-tubocurarina (.5-1.5 ml/lit) no redujo la liberación de sustancias que aumentan la actividad de colinesterasa. Sin embargo cuando bloquearon la liberación vesicular presináptica con Mg^{++} (10 mM) redujeron significativamente la liberación de estas sustancias. De este modo los autores concluyen que sustancias que poseen una

influencia sustancial y muy significativa de inervación, estudiadas por la actividad colinesterasa y por la sensibilidad colinérgica, se mueven por el axón, se liberan del nervio por estimulación y están presentes en músculos inervados y aparentemente ausentes en músculos denervados. Cabe mencionar que aunque los autores no hablan aquí de sustancias proteicas, los estudios de Musick y otros por discutir sugieren fuertemente que también en este caso se trate de sustancias de naturaleza proteica.

Unos de los trabajos pioneros en relación a la transferencia transináptica de proteínas en un sistema in-vitro, fué llevado a cabo por Korr y col. en 1967. Estos autores usando autorradiografía mostraron que sustancias marcadas con ^{32}P y ^{14}C e inyectadas en el núcleo hipoglosal del conejo, se transportan por el nervio hipogloso y al cabo de algunos días llegan de manera específica a las células musculares de la lengua. En cambio cuando la marca era introducida en el LCR esta llegaba indiscriminadamente a todos los distintos tipos celulares encontrados en la lengua.

De esta manera los autores concluyen que cuando sustancias radioactivas son introducidas selectivamente en las neuronas hipoglosales, estas o sus derivados, se transportan vía axonal específicamente a las células musculares de la lengua. En un trabajo posterior (Appeltauer y Korr, 1975) hicieron un análisis más refinado de sus previos hallazgos. En este estudio se efectuó la inyección de ^{3}H -LEU en el núcleo hipoglosal del conejo y analizaron las sustancias marcadas que llegaron a la lengua a los días 1, 12, 22 y 34 posterior

a la inyección de la marca. Este análisis demostró que el contenido protéico era diferente para los cuatro periodos mencionados.

Los autores tratan de explicar el posible origen de estas cuatro distintas "ondas proteicas" y sugieren que: Las proteínas del periodo uno (primer día) se deben atribuir al transporte axonal rápido, el cual lleva fundamentalmente elementos estructurales. Las proteínas del periodo dos (12 días) corresponde a proteínas insolubles con actividad específica alta y algunas proteínas solubles que llegan por medio del transporte axonal lento. Las proteínas del periodo tres (22 días) serían proteínas solubles con actividad específica alta las cuales se han rebrassado en su paso del nervio al músculo. Las proteínas del periodo cuatro (34 días) probablemente representa el arribo de proteínas insolubles transportadas a una velocidad de transporte relativamente lenta y quizás también a un transporte reverso de proteínas insoluble correspondiente a un gradiente próximo-distal formado a lo largo del nervio en el periodo de los 22 a los 34 días. Aunque estos resultados no eliminan la posibilidad de que las proteínas radioactivas, solubles e insolubles encontradas en el músculo estén confinadas a las terminales nerviosas, evidencias previas por medio de autorradiografía y otros estudios discutidos y por discutir, sugieren que estas proteínas, o parte de ellas son liberadas de las terminales nerviosas.

Otro estudio in vitro, pero que incluye otro tipo de

Preparación, también estudió la liberación de proteínas de células nerviosas. Hines y Garwood, 1977 usaron una preparación que incluye a los ganglios de la raíz dorsal octava y novena con sus raíces, el nervio siático y el músculo gastronemio. Una cámara de tres apartados separados por silicona permitió incubar aisladamente al ganglio y sus raíces (separado del nervio (apartado B) y del músculo (apartado C) por 5 horas con ^{14}C -LEU (apartado A)), seguido por otro período de incubación pero sin el precursor radioactivo. El compartimento B donde se encuentra el nervio siático se perfunde con Ringer a razón de 1.68 ml/hr y se colectan fracciones para el análisis de proteínas marcadas cada hora. Mientras tanto, en el apartado C, el músculo gastronemio se incubó con una solución Ringer oxigenada. Los resultados mostraron que existe una liberación de proteínas en el apartado B y se liberaron aproximadamente 75-125 ug de proteínas durante las 20-25 horas que duró el experimento. Esta concentración equivale a menos del 1% de las proteínas del nervio pero aún 10-40 % de la radioactividad contenida en el mismo. Cuando incubaron al ganglio con Cicloheximida (100 ug/ml) se bloqueó la liberación de las proteínas de los axones. Sin embargo, cuando se incubó con Cicloheximida al apartado B (que contenía al nervio), se inhibió la síntesis de proteínas axonales y de células de Schwann, pero no se bloqueó la liberación de proteínas marcadas. Se usaron además gels de acrilamida con SDS para separar las proteínas marcadas y al cortar rebanadas del gel de 2 mm cada una, se comprobó que el 80-85% de la marca radioactiva se confirió en

dos bandas de movimiento rápido. Los resultados de este estudio sugieren que las proteínas marcadas liberadas al medio de perfusión fueron sintetizadas en el ganglio y transportadas al axón previo a la liberación.

En un trabajo previo, Hines y Easton, 1971 mostraron que proteínas eran liberadas al medio de incubación en una preparación in-vitro del nervio olfatorio desmielinizado, pero no fue posible determinar si estas proteínas venían del axón o de las células de Schwann.

En este trabajo ya es posible deducir que la proteína es producida por el soma neuronal y que además se libera al medio de incubación después de transportarse axonalmente por la vía rápida.

En 1981 Tedeschi y col. repitieron el trabajo de Hines y Garwood de 1977 y según ellos de manera más controlada, evidenciaron que tal magnitud de liberación no es real. Ellos encontraron que una gran parte de la radioactividad encontrada en el medio provenía de marcaje local y liberación del nervio.

Además estos autores arguyen que para medir la liberación de proteínas del axón, la preparación con el nervio siático no es la óptima, ya que tiene muchos axones mielinizados, por tanto una gran parte del material liberado por axones puede ser tomado fácilmente por las células de Schwann que rodean a los axones. Por otro lado, y basado además en el reporte de Lasek, 1974 el cual demostró que existe una gran cantidad (> 50%) de proteínas recién

sintetizadas que pasan de las células de Schwann al axón gigante del calamar, es probable que una parte importante de la marca encontrada provenga de proteínas marcadas y liberadas de células gliales en el ganglio y de células de Schwann en el segmento inicial del nervio, seguido por un movimiento en los espacios extracelulares a lo largo del nervio.

2.- Estudios en Rebanadas de Tejido Nervioso

También se han realizado trabajos sobre liberación de proteínas en rebanadas de tejido nervioso. En un bonito trabajo del grupo de Shashoua (Duffy y col., 1981) se mostró que la potenciación a largo plazo (PLP) (que se ha usado como un modelo para estudios neurofisiológicos de plasticidad) de rebanadas de tejidos del área hipocámpal, produce un aumento de la incorporación de ^{14}C -Val en proteínas que son posteriormente liberadas al medio extracelular. Es interesante notar que cuando la estimulación no fué específica o cuando se estimuló sin llegar a producir la potenciación, no hubo tales aumentos en la secreción de estas proteínas. Este hecho sugiere que es el desarrollo de la PLP, el factor esencial para los cambios en el metabolismo protéico observado. Como se verá mas adelante, estos cambios metabólicos producidos por PLP son similares a los efectos producidos el entrenamiento para la adquisición de una nueva conducta en experimentos realizados en el pez Carpa.

Recientemente este mismo grupo de investigadores ha publicado dos importantes trabajos sobre la liberación de proteínas *in-vitro*.

En el primero de ellos, Shashoua y col. 1984 mostraron que la proteína S-100 se libera al líquido extracelular. Usando tres diferentes modelos: 1) LEC de cerebros perfundidos por medios isotónicos; 2) Colecciones del medio de perfusión de rebanadas de tejido hipocampal; y 3) Por medio de muestras de LCR de la rata, mostraron que los niveles de S-100 son de 3-6 veces mayores que los encontrados en las fracciones citoplasmáticas solubles de los mismos tejidos. Estas diferencias en los niveles de esta proteína en las fracciones extracelulares relativas a fracciones intracelulares indican que la S-100, una proteína ácida que constituye 0.1-0.2% del total protéico soluble del cerebro, se libera selectivamente a los espacios extracelulares del tejido nervioso. Cabe mencionar que Cosgrove y col. 1983 mostraron que la mayor porción de esta proteína parece ser sintetizada en poliribosomas membranales, una característica que comparten muchas proteínas liberables de otros tejidos biológicos.

En el otro trabajo de este mismo grupo, Hesse y col. 1984 mostraron que rebanadas de hipocampo liberan proteínas al medio de perfusión de manera continua a razón de 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido/hora. El análisis de LDH demostró que esta liberación no es producto de lisis celular. Además se mostró que estas proteínas tienen un tiempo de vida media muy corto

(aproximadamente 4 hrs.) y que pueden ser distinguibles de la fracción soluble citoplasmática por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Por medio de la técnica de marcaje doble, estos autores mostraron además que las proteínas liberables parecen ser más glicosiladas que las proteínas que se quedan en el tejido y no se liberan. Estas proteínas y glicoproteínas se encuentran en el rango de los 14 K y los 86 K daltons. Es interesante que cuando las muestras se procesan con Buffer sin Ca^{++} , sóloamente los picos de 14 K y 18 K daltons se distinguen en el gel. Los resultados de este experimento son por tanto consistentes con la noción de que existe un grupo de proteínas en el hipocampo las cuales son selectivamente liberadas al líquido extracelular.

En otros dos trabajos Sandberg y col 1980 a,b estudiaron el papel del Ca^{++} en la formación y liberación de sustancias radioactivas (provenientes del transporte lento) en rebanadas de tejido cerebral (colículo superior) del conejo.

En el primer trabajo estudiaron el efecto de manipulaciones con K^{+} sobre las fracciones solubles y precipitadas con TCA. Ellos mostraron que la radioactividad en la fracción soluble representa un pequeño porcentaje (0.5-3.2%) del total de la marca en el tejido y que proviene fundamentalmente de degradación proteica. Cuando analizaron el medio de perfusión, aunque existieron variaciones dependiendo del aminoácido usado (con 3H -Glicina se obtuvieron los mejores resultados) la radioactividad de la fracción soluble a TCA fue también mayor que la fracción

precipitada con TCA.

La perfusión de las rebanadas con alto K^+ mostró por un lado que los aumentos en la liberación de sustancias solubles en TCA son mucho mayores que las precipitadas con este ácido (1-3 órdenes de magnitud) y por otro lado que este aumento en sustancias liberadas, fundamentalmente las solubles al TCA fue dependiente de Ca^{++} .

En el segundo estudio, usando la misma preparación pero solo esperando que los componentes de transporte axonal rápido llegen al colículo superior, observaron otra vez que alto K^+ produce un mayor aumento en la fracción soluble en TCA que la fracción precipitable a este tratamiento. Un resultado muy interesante fue que al quitar el Ca^{++} del medio, observaron que la liberación espontánea de GABA exógena, aminas primarias y material precipitado por, pero no el soluble en TCA, aumentaba. Este resultado sugiere que el mantener el tejido en un medio sin Ca^{++} , aumenta la permeabilidad de las membranas de células nerviosas (Potashner, 1978) y con ello un aumento en la liberación de diferentes moléculas que incluye a proteínas. Sin embargo ambas fracciones (solubles y precipitadas con TCA) mostraron ser dependientes de la presencia de Ca^{++} cuando se evocaba una liberación con alto K^+ . Además observaron que la presencia de Ca^{++} era fundamental para la degradación (posiblemente debido a proteinasas dependientes de Ca^{++} (Guroff, 1964)) de proteínas transportadas axonalmente, para dar proteínas solubles, pequeños péptidos y amino-ácidos.

De los resultados de estos trabajos, se sugiere que las terminales nerviosas pueden liberar cantidades considerables de productos de degradación proteica, dependiente de actividad sinéptica y que en condiciones de concentraciones bajas de Ca^{++} y no dependientes de la actividad, la liberación espontánea de distintas moléculas que incluye a proteínas puede llevarse a cabo representando quizás un importante medio de comunicación intercelular.

3.- Estudios con Células Gliales

Distintos estudios que han usado a preparaciones de células gliales en cultivos (principalmente los que han usado la mono capa glioma C6) han mostrado que también las células gliales poseen la capacidad de liberar proteínas.

Arenander y de Vellis, 1980; 1981a, b, en tres estudios sucesivos muestran que las células del glioma C6, liberan al medio de cultivo una gran cantidad de proteínas (más de 400 puntos son detectados en el fluorograma) y glicoproteínas que se pueden distinguir en base a su carga y tamaño por medio del 2D-SDS-PAGE. Junto con esto, estudiando el efecto de un esteroide (hidrocortisona) pudieron identificar diferentes familias de proteínas que responden de manera diferente a este tratamiento. Además, observaron que el medio condicionado (que incluye a las proteínas liberadas de las células C6) produce un crecimiento en neuritas de células PC12 y alteran la morfología de las células PCG2. Esta

capacidad de modificar el crecimiento de células, no fue alterada por diálisis ni por liofilización del medio de cultivo.

Barde y col., 1978 mostraron también que factores liberados de células de glioma en cultivo, poseen la capacidad de promover el crecimiento de neuronas sensoriales. De igual manera, diferentes autores (Schübert, 1973, 1976, 1978; Truding y col., 1975; Littauer y col., 1980 y Salton y col., 1983 entre otros) han reportado la liberación de proteínas y glicoproteínas de cultivos de células gliales con capacidad de modificar el desarrollo de células nerviosas en crecimiento. Por otra parte, es hoy ampliamente aceptado que tanto la línea C6 como células gliales normales poseen la capacidad de sintetizar y liberar al medio de cultivo, el factor de crecimiento nervioso (FCN), una proteína con potentes capacidades reguladoras de crecimiento y diferenciación tanto en sistemas in-vivo como in-vitro (Longo, 1978). Aún más, recientemente Yávin y col., 1986 han mostrado que tanto el FCN como algunos gangliósidos, estimulan la liberación de un grupo de glicoproteínas de la línea de células PC12 al parecer destinadas específicamente a ser liberadas. A pesar de que no se conoce la función de la mayoría de estas proteínas, las características que posee el FCN hacen pensar que estos factores podrían poseer también una función trófica.

4.- Estudios en Cultivo de Tejido Neuronal

En otro trabajo sobre la liberación de proteínas en sistemas in-vitro, K. Sweadner, 1981 reportó la liberación espontánea de proteínas de un cultivo de neuronas simpáticas disociadas, provenientes del ganglio cervical superior de ratas jóvenes. En este estudio se observó una liberación de 16-18 proteínas solubles que son distintas de las glicoproteínas de la membrana celular. Estas proteínas corresponden al 2-3% de las proteínas recién sintetizadas y su t_{1/2} es de alrededor de 9 horas. Sweadner demostró además que esta liberación es independiente de la liberación del NT y la liberación se lleva a cabo por la región distal del axón y probablemente también del cuerpo celular y de dendritas. Junto con esto reportó que cuando a estas neuronas simpáticas que son adrenérgicas se les cultiva en un medio que contiene además células de corazón, estas células se vuelven colinérgicas (o con una función dual) y esto modifica dramáticamente la liberación de 4 de las 18 proteínas liberadas. Este hecho sugiere una correlación entre la expresión de estas proteínas secretadas y el neurotransmisor elegido, o como Patterson ha sugerido, (Patterson,1978) con la diferenciación celular, ya que esta "elección" de transmisor parece ser un camino de diferenciación celular. Al respecto en un reciente trabajo se reportó que lesiones a una

área colinérgica del SNC produce un cambio en la expresión de proteínas tisulares de este tejido (Heydorn y col, 1985).

Gracias a que estudios in-vitro permiten el control preciso de las condiciones experimentales, Sweadner realizó una serie de controles para eliminar el posible origen artefactual de estas proteínas. Así por ejemplo, cuando se incubaron las células con 100 μM de cicloheximida, no hubo incorporación de ^3H -leucina con lo que se infiere que las proteínas son realmente sintetizadas por las células. Cuando se comparó el patrón electroforético de estas proteínas liberadas con el patrón de proteínas de suero de rata, de lisis celular, y también de fracciones membranales crudo o parcialmente purificadas, se mostró que eran diferentes. Además, se pudo verificar que el patrón electroforético de estas proteínas liberadas no varió al incubar las células con inhibidores de proteasas con lo que se infiere que estas proteínas no son producto de degradación proteolítica.

Este dato queda también corroborado por el hecho de que cuando se intentó repetir o acelerar la liberación espontánea de proteínas con 1-100 $\mu\text{g/ml}$ de tripsina, quimotripsina, papaína, pronasa, fisina y colagenasa, nunca se obtuvo éxito.

Ya que estas proteínas liberables se marcaron cuando se incubaron las neuronas con ^3H -Fucosa o glucosamina, se infiere también que éstas son glicoproteínas. Cuando se probaron una serie de manipulaciones que se sabe producen una disminución de la liberación de neurotransmisores, tales como omitir el Ca^{++} o agregar Mg^{++} ó Co^{++} , no se modificó significativamente el patrón ni la cantidad de proteínas

liberadas. Cuando se usaron manipulaciones que producen un aumento en la liberación del NT como la incubación en un medio de alto K^+ (54 mM) se observó que las proteínas liberables aumentaron, resultado que no fue significativo, comparado con el aumento de liberación de 3H -norepinefrina. Sin embargo, al usar la neurotoxina (veneno de la araña viuda negra), la cual induce específicamente una exocitosis masiva de las vesículas sinápticas, un nuevo grupo de proteínas liberadas apareció en el medio de cultivo. Este hecho ocurrió independientemente si el cultivo era colinérgico o adrenérgico.

Es importante señalar que aunque las evidencias mencionadas no prueban si el origen de estas proteínas liberadas corresponde a una poza intracelular o a la superficie membranal, las evidencias sugieren fuertemente la existencia del fenómeno llamado secreción protéica neuronal.

Siguiendo con sus estudios, K. Sweadner en 1983 decidió poner especial atención a aquellas proteínas que no se liberan espontáneamente sino que fueron liberadas al medio de cultivo, sólo cuando se usó el veneno de la araña viuda negra. En este trabajo se muestran evidencias de que dos de estas proteínas de alto peso molecular se encuentran en las superficies de las neuronas y son modificadas después que han sido traducidas, glicosiladas e insertas en la membrana plasmática. B1 (230,000) y B3 (200,000) se modifican para dar dos proteínas de PM más bajo, B2 (215,000) y B4 (185,000). Además B1 y B3 son derivadas de dos precursores.

P1 (210,000) y P3 (185,000) que son proteínas no glicosiladas, ricas en manosa y que se encuentran en la superficie celular.

Cuando el medio de cultivo se condiciona para evocar una mayor liberación del NT, las B1 y B3 se convierten en B2 y B4 de manera más rápida que en un medio no condicionado. Además, éstas se liberan al medio en una forma transformada soluble (S2 y S4). Esta liberación evocada es dependiente de Ca^{++} y se detecta sólo en circunstancias que favorecen una rápida liberación del NT. Un dato importante es que en ausencia de Ca^{++} se puede evocar la liberación del NT pero no el de estas proteínas. Esto sugiere por tanto, que la liberación de proteína no es un paso esencial en la liberación del NT, pero puede acompañarlo. La accesibilidad a lactoperoxidasa, galactoxidasa, neuraminidasa y tripsina en células intactas, sugiere fuertemente que estas proteínas se encuentran en la superficie celular. Además, el hecho de que éstas pueden ser liberadas en la forma soluble, también sugiere que más que estar entrelazadas de manera compleja en la bicapa de lípidos, es posible que se encuentran ancladas a la membrana por su región hidrofóbica, lo que facilitaría el proceso de liberación.

Con el objeto de definir la relación de estas proteínas liberables con la liberación de neurotransmisores, se realizaron una serie de manipulaciones depolarizantes, las cuales mostraron que existe una separación entre la liberación de proteínas y del NT. La liberación del NT no siempre necesita Ca^{++} para su liberación, en cambio las proteínas no se liberan sin Ca^{++} en el medio de cultivo.

Sweadner también discute algunas hipótesis en relación al mecanismo de la liberación proteica. Así, la hipótesis más simple es que las proteínas son liberadas de la superficie celular simplemente por un proceso de proteólisis limitada. Por ejemplo, y asumiendo que las proteínas están unidas a la membrana por su región hidrofóbica, la liberación podría ser trabajo de una proteasa dependiente de Ca^{++} o de algún proceso proteolítico activado por Ca^{++} (Baudry y col., 1981; Rodemann y col., 1982). Showell y col., 1977 mostraron evidencia de que leucocitos polimorfonucleados liberan proteasas lisosomales al medio extracelular, de forma dependiente de Ca^{++} . Sin embargo, para S2 y S4 no se ha observado una inhibición de la liberación usando inhibidores de proteasas.

Quizás, la recaptura de las membranas vesiculares, que se unieron a la membrana plasmática durante la exocitosis podría requerir la modificación de proteínas de la superficie celular. El reciclaje vesicular ha sido estudiado bastante en detalle por varios autores (Kelly y col., 1979; Holtzmann, 1981) y parece que al menos existen dos mecanismos para este reciclaje. Uno que se llevaría a cabo a niveles de estimulación bajos en el cual las vesículas sinápticas serían recapturadas y recicladas como vesículas pequeñas, sin que ocurra en este proceso algún cambio morfológico importante. El otro, que se llevaría a cabo a altos niveles de estimulación, produciría que pedazos grandes de membrana se introducirían formando cisternas intracelulares, las cuales

serían degradadas o recicladas a vacuolas sinápticas. Ceccarelli y Hurlbut, 1980 mostraron que la recaptura de la membrana requiere Ca^{++} extracelular en la unión neuromuscular tratada con niveles bajos del veneno de la araña viuda negra. Además, Ba^{++} aumenta la liberación de NT incrementando la recuperación de las membranas por vacuolas y La^{+++} a altas concentraciones produce la liberación del NT y bloquea la recuperación de la membrana. Todos los efectos mostrados son paralelos a los efectos observados sobre la liberación de proteínas. Así, los efectos de calcio y sus análogos, sugieren una buena correlación entre la liberación de proteínas de la superficie celular y la recaptura membranaral en vacuolas o cisternas.

En un artículo posterior, Sweadner, 1983b, profundizó más sus investigaciones sobre estas proteínas liberables y demostró que estas proteínas se liberan al medio en forma de monómeros solubles. A través de un análisis hidrodinámico se indicó que estas proteínas poseen probablemente una estructura fibrilar. Además, mostró que el verdadero PM es 130 K y 17 K para las S2 y S4, con lo que se demuestra que el valor de PM según electroforesis en SDS estaban sobreestimado entre un 25-30%.

B.- LIBERACION DE PROTEINAS EN SISTEMAS IN-VIVO

1.- Liberación hacia el LCR

En una serie de estudios sobre la liberación de proteínas in vivo, (Barkai y col., 1978; Barkai, 1979), mostraron la existencia de una liberación continua de proteínas cerebrales hacia el LCR por medio de la perfusión ventrículo-cisternal en conejos no anestesiados. Estos autores, motivados por los hallazgos de Drucker-Colin y col., 1975b decidieron estudiar los efectos de la manipulación farmacológica (por medio de la administración de pentobarbital y haloperidol) sobre los niveles de proteína y cambios en los niveles de metabolitos monoaminérgicos (ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y ácido homovanílico (HVA)) en el LCR de conejos. Los autores mostraron que los niveles de proteínas de los perfusados se mantenían "relativamente" constante durante las 6 horas de perfusión. La concentración media de proteínas totales de las muestras de perfusado de animales no anestesiados y sin tratamiento farmacológico fue de 780 ± 97 ug/ml. Más de un 85% de estas proteínas resultaron ser mayores que 50 K daltons. Cuando los animales fueron tratados con pentobarbital (a nivel que produjera anestesia) la concentración de estas proteínas (las > 50 K) que era de 650 ± 86 ug/ml bajó a 266 ug/ml correspondiendo a una disminución del 60%. Aún más, cuando los animales fueron tratados con haloperidol, los niveles llegaron a 166 ± 38 ug/ml que representa un 70% menos que los niveles en animales sin tratamiento farmacológico. En relación a proteínas con PMS \leq de 50 K daltons, la concentración promedio en animales controles fue de 82 ± 18 ug/ml y ambas drogas produjeron una

disminución de los niveles en el LCR de alrededor de un 50%. El resultado de los efectos de la administración de pentobarbital, sobre los niveles de proteínas de los perfusados del LCR está en completa concordancia con los resultados de Drucker-Colin y col., 1975b los cuales mostraron una rápida disminución de los niveles protéicos de perfusado, después de la administración de pentobarbital sódico. Es sin embargo interesante que los autores terminan la discusión de este trabajo mencionando "la realización de más estudios que permitan determinar si los cambios en proteínas solubles extracelulares del cerebro son causados por artefactos experimentales o corresponden a componentes esenciales de la función neuronal, es obviamente requerida".

Barkai, 1979, basado en sus anteriores resultados y en conocimiento del importante papel que serotonina (5-HT), parece tener en la regulación del ciclo sueño-vigilia, decidió investigar la relación entre el recambio de 5-HT cerebral con la secreción de proteínas al LCR. El recambio de 5-HT fue estimado por un método que combinó la perfusión ventrículo-cisternal con la dilución de isótopo (5-14C-HIAA) que permite simultáneamente estimar la dinámica de aparición y desaparición de (5-HIAA) en el LCR. Así se puede abordar la pregunta sobre si los cambios en la concentración de proteínas en el LCR son relacionados causalmente a los cambios en la producción de 5-HIAA (recambio de 5-HT) ó a su extracción de LCR ó a ambos. Los resultados de este experimento mostraron que existe una relación lineal positiva

con una $r=0.71$ entre el metabolismo de 5-HT y la secreción de proteínas al LCR. Cabe mencionar que esta relación lineal existe con proteínas liberadas al LCR que son menores de 50 K dalton y que representan menos del 15% del total proteico encontrado en el LCR (desgraciadamente el autor no menciona lo que ocurre con las otras proteínas). Cuando se calculó la velocidad de aparición de proteínas en el LCR, se encontró que proteínas menores de 50 K aparecen a una velocidad de 2.2 - 6.7 $\mu\text{g}/\text{min}$ con un valor promedio de 4.5 $\mu\text{g}/\text{min}$. Pentobarbital y haloperidol modificaron este valor a 1.75 $\mu\text{g}/\text{min}$ y 2.14 $\mu\text{g}/\text{min}$ respectivamente. Al estudiar el efecto de estos dos fármacos sobre relación existente entre liberación de proteínas y concentración de metabolitos de serotonina, observaron que pentobarbital reduce ambas, la liberación de proteínas y el recambio de 5-HT. En cambio haloperidol posee un efecto distinto, ya que disminuye la liberación de proteínas a la vez que aumenta el recambio de 5-HT.

La relación entre el metabolismo de 5-HT y la liberación de proteínas hacia el LCR, no deja de ser interesante, sobre todo dado la extensa, aunque controversial literatura que relaciona el metabolismo de 5-HT con etapas de sueño (Jouvet, 1969) y por la relación con los períodos de sueño MOR que parece tener la liberación de un grupo de proteínas al espacio extracelular (Drucker-Colin y col., 1975).

2.-Liberación hacia el LEC

Existen fundamentalmente dos líneas de investigación que han estudiado en sistemas in-vivo la liberación de proteínas al líquido extracelular. La primera línea de estudios ha sido desarrollada por el grupo de Shashoua y colaboradores los cuales han mostrado a través de una serie de reportes la posible participación de proteínas específicas liberadas al espacio extracelular en procesos de aprendizaje. Usando principalmente al pez Carpa como animal de experimentación y con la ayuda de técnicas de marcaje doble, lograron identificar un grupo de glicoproteínas que se liberan al espacio extracelular y cuyo recambio aumenta posterior a la adquisición de un nuevo aprendizaje. De acuerdo con Shashoua, estas proteínas que se liberan de células nerviosas participan en una importante etapa de una compleja secuencia de eventos que llevará en último término a la formación de memoria de largo plazo, (Shashoua,1985).

La segunda línea de estudios se refiere a la posible participación de proteínas liberables al LEC en el control de algunos aspectos del ciclo sueño-vigilia . Dado a que estos estudios representan un grupo importante de información en relación al presente trabajo, una discusión mas detallada de este tema se realizará mas adelante.

XII.- LIBERACION IN - VITRO e IN - VIVO DE PROTEINAS CON ACTIVIDAD ENZIMATICA

A.- ACEILCOLINESTERASA (AChE)

En los últimos años la enzima acetilcolinesterasa (AChE, E.C. 3.1.1.7) ha adquirido la distinción de ser una de las neuroenzimas mejor estudiadas. Diversos estudios y concomitantes avances se han llevado a cabo en relación a su mecanismo de acción, la naturaleza de su sitio activo, su distribución y localización en tejidos y su función, al menos en el ganglio y la unión neuromuscular.

Desgraciadamente para nuestros propósitos, el área más pobre en estudios para esta enzima es el concerniente al papel de la enzima fuera de sinapsis colinérgicas. Sin embargo, y como veremos más adelante, hoy existe un número nada despreciable de investigaciones al respecto.

Esta enzima existe en diferentes formas moleculares que probablemente llevan a cabo a través de distintos mecanismos, funciones diversas. La AChE es una larga glicoproteína que comprende al menos seis diferentes formas estructurales y que desafortunadamente su secuencia de aminoácidos aún no se ha completado. En el tejido nervioso, la AChE más abundante es la forma globular G₄ y al parecer la forma A₁₂ es la forma

predominante que se destina por transporte axonal hacia las terminales y posiblemente para su liberación (Brimijoin, 1983).

No cabe duda de que es esta enzima la que mejor ha sido estudiada como representante de proteínas liberables del SNC. A pesar de que ya en 1930, Plattner y Hinter reportaron la existencia de actividad colinesterasa en el LCR de humanos, poca atención se le ha dado al estudio del origen de esta enzima en el LCR. A simple vista parecen existir 2 posibles fuentes de origen que explicarían la presencia de AChE en el LCR. Una posibilidad es que esta enzima provenga del plasma sanguíneo y que llegue al LCR como al igual que otros constituyentes proteicos, a través de los plexos coroideos (Davson, 1970). La otra posibilidad es, como lo han señalado otros autores, que su origen radique en el tejido nervioso del cerebro y/o de la espina dorsal (Svensmark, 1961; Yaksh y Col, 1973).

La primera posibilidad no parece ser muy razonable ya que en el plasma existe solo la colinesterasa no específica (Cn-s E.C. 3.1.1.8.), en cambio el LCR contiene actividad acetilcolinesterasa (AChE) E.C. 3.1.1.7.

La segunda posibilidad parece mas razonable en base al hecho de que muchas neuronas del SNC contienen AChE (Silver, 1974) incluyendo aquellas que están en contacto directo con el LCR (Vigh y Vigh-Teichman 1973), de este modo la enzima podría liberarse al LCR ya sea como resultado de un daño o muerte neuronal o como parte de un proceso de liberación fisiológico. La posibilidad de que la AChE sea liberada de

neuronas fue estudiada por (Chubb y Smith, 1974 y 1975), los cuales mostraron que un tejido periférico que recibe inervación colinérgica como es la médula de la glándula adrenal, puede liberar una isoenzima de AChE cuando éste se trata con varios agentes depolarizantes.

El mismo grupo de Chubb y Col. 1976, mostró también que la estimulación eléctrica de terminales centrales de los nervios siáticos y safénos en conejos anestesiados produce un aumento en la actividad AChE en el LCR la cual llega a un máximo de 3 veces sobre el nivel basal 100 minutos posterior al término de la estimulación. Ellos arguyen que el origen de la AChE no es el plasma ya que la actividad específica de la enzima en el LCR es mucho más alta que la del plasma y además, el patrón electroforético de la isoenzima de AChE es diferente en ambos fluidos. Además mostraron que a pesar que los niveles proteicos totales del LCR son variables, estos no reflejan los cambios en la concentración de la AChE. El hecho de que tanto la concentración de K⁺ como la de LDH se haya mantenido constante durante la estimulación, elimina la posibilidad de que una destrucción celular sea la causante de la presencia de AChE en LCR.

Tanto en la médula de la glándula adrenal como en el SNC una parte de la AChE se encuentra en forma soluble y a pesar de que existen diferentes isoenzimas, ambos líquidos (LCR y perfusado de la glándula adrenal) contienen solo una isoenzima, la isoenzima V.

En este trabajo se muestra además, que un estímulo depolarizante que se sabe que produce la liberación de

acetilcolina (ACh), también producen la liberación de AChE. Por tanto es probable, que por lo menos una parte de la actividad AChE encontrada en el LCR sea resultado de una liberación dependiente de depolarización.

Ahora bien, como la AChE liberada de neuronas centrales tiene acceso al LCR? No se conoce que exista una barrera tal para impedir este acceso. Al respecto Brightman, 1968 mostró que proteínas introducidas al LCR pueden cruzar el epéndimo y eventualmente ser tomadas por las terminales nerviosas. De tal manera que vías por las cuales sustancias como la AChE podrían llegar al LCR si existen. En relación a este punto Kreutzberg y Kaiya, 1974., mostraron que la AChE inyectada ya sea en el parénquima del cerebro anterior o en los ventrículos cerebrales; podía difundir por los espacios extracelulares a una velocidad de unos pocos milímetros por día (quizás sea esta la explicación de la latencia de 100 minutos entre el estímulo y la presencia de actividad mencionada por Chubb y col, (1976) y que podía ser tomada retrógradamente por las terminales nerviosas. Es más, en base a estos resultados los autores sugirieron que la AChE podría ser usada como trazador de vías extracelulares del cerebro.

De esta manera Chubb y Col, 1976 concluyen que es muy posible que las neuronas que contengan AChE liberen una de las isoenzimas al líquido extracelular y que de ahí lleguen al LCR.

Más adelante Fuenmayor y Col, en 1976, corroboran la liberación concomitante de ACh y AChE y muestran que tanto la

estimulación del nervio siático del gato, como la inyección de pentilentrazol (30 mg/kg, que sabe que libera ACh del tejido nervioso) producen una liberación de ACh detectable en el LCR. Estos autores sugieren que el aumento de ACh en el LCR se puede deber a: 1) aumento en la actividad colinérgica neuronal; 2) a un edema cerebral, o 3) a alteraciones en la membrana celular que no permite la acumulación de líquidos en el cerebro.

Greenfield y Col. en 1978, estudiaron los efectos de clorpromacina (CPZ) (que aumenta la actividad colinérgica) sobre las concentraciones de ACh en el LCR de conejos. Posteriormente, en 1979, Greenfield and Smith, mostraron que tanto estimulación eléctrica de un nervio sensorial como la estimulación eléctrica del núcleo caudado del conejo, produce un aumento de la concentración de ACh en el LCR. La aplicación de CPZ i.v. en el conejo resultó en un aumento de la concentración de ACh en el LCR obtenido de la cisterna magna (CM), no encontrándose tal aumento (5 veces la basal) en muestras del ventrículo lateral (VL). También encontraron que la inyección de atropina previo a la administración de CPZ, evitaba el aumento de la actividad de ACh. En base a las diferencias entre las concentraciones de CM y VL, los autores sugieren que este fenómeno podría ser el resultado de una liberación de ACh en sitios más posteriores al núcleo caudado. De este modo, es probable que células dopaminérgicas de la sustancia nigra, que también contienen altas cantidades de ACh (Butcher y Col. 1975) y cuya frecuencia de disparo aumenta, producto de la administración de CPZ (Bunney y Col.

1973), sean los causantes de las diferencias de concentración entre los sitios ya mencionados. El efecto de atropina podría quedar explicado por los estudios que revelan que las células dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia nigra muestran una excitación que es sensible a drogas anticolinérgicas como la atropina (Lichensteiner y Col. 1976).

Skau y Brimijoin, 1978 estudiaron la liberación de AChE por estimulación eléctrica del nervio frénico en una preparación "in-vitro". Estos autores mostraron que la liberación máxima de AChE, se encontró estimulando el nervio a una frecuencia de 200 HZ y que a estos niveles de estimulación se producía un 32% más de liberación por sobre los niveles basales. Cabe mencionar que con frecuencias de estimulación de .2 HZ los niveles de AChE ya eran significativamente más altos que los de la basal. Además, mostraron que concentraciones bajas de Ca^{++} y altas de Mg^{++} , los cuales inhiben la liberación de ACh, redujeron parcialmente los niveles espontáneos de AChE, pero inhibieron totalmente los altos niveles de liberación evocada por la estimulación eléctrica. Estos datos hablan de una similitud entre los mecanismos de liberación de ACh y AChE.

Sin embargo existe una importante diferencia. AChE mostró niveles de liberación proporcionales a la frecuencia de estimulación por arriba de 200 HZ, en cambio la liberación de ACh se correlacionó solo con frecuencias de estimulación que no pasan los 25 HZ (Straughan, 1960). Estos datos

llevaron a sugerir que la liberación de ACh y de AChE puede llevarse a cabo en forma paralela, pero separados, ya sea anatómicamente o por un proceso o mecanismo de liberación distinta.

En otro estudio realizado en perros (Barreggii y Giacobini, 1978) se mostró también que Clorpromacina produce una elevación significativa de los valores de AChE en el LCR, pero esta vez con una latencia de una hora posterior a la estimulación. Los autores mencionan que la actividad AChE muestra una clara tendencia hacia un gradiente creciente caudo-craneal a diferencia de una serie de metabolitos monoaminérgicos que muestran un gradiente cráneo-caudal (Aschroft y Col. 1968); Naira y Col. 1975). Este gradiente apoya además el origen cerebral de AChE y por tanto podría reflejar actividad neuronal.

Greenfield y Smith 1979 continuaron estudiando de manera más fina las bases fisiológicas de la actividad AChE encontrada en el LCR. Esta vez estimularon eléctricamente, el núcleo caudado (NC), la sustancia nigra (SN) y el hipotálamo lateral (HL) y midieron niveles de AChE obtenidos en cisterna magna y ventrículo lateral del conejo. Los resultados mostraron que la estimulación de estos tres sitios anatómicos produce una elevación de los niveles de esta enzima en el LCR pero fundamentalmente en el obtenido de cisterna magna.

Los niveles de la enzima en el ventrículo lateral fueron más bajos. Incluso, la estimulación del NC ipsilateral al ventrículo no produce los aumentos de actividad de AChE observados en CM. Se realizaron estimulaciones controles

tanto en la cápsula interna como en el tálamo antero-dorsal y además se hicieron los controles de lesión tisular midiendo la enzima LDH. Una posible explicación a este resultado estaría dada en el hecho de que la AChE se liberaría de una estructura mas posterior como consecuencia de la estimulación del NC. Estos mismos autores encontraron que cuando se lesiona electrolíticamente la SN, los niveles basales de AChE obtenidos de la CM eran practicamente la mitad de los obtenidos en animales sin lesión. Además observaron que esta lesión bloqueó los efectos producidos por la estimulación ipsi y contralateral del NC. Estos resultados sugieren por un lado que la mayor parte de la actividad AChE, proviene de la SN y que la AChE encontrada en LCR cisternal no se origina del NC sino que probablemente de la SN o regiones conectadas con esta estructura.

Cabe mencionar que la ausencia de efecto por estimulación del NC contralateral a la SN lesionada abre la posibilidad de una intercomunicación entre ambos lados del sistema nigro-estriatal. De hecho ya existen evidencias electrofisiológicas (Hull y Col, 1979), y bioquímicas (Nieuouillon y Col 1977) sobre esta interdependencia. Esta interrelación entre los dos sistemas nigroestriatales involucran a células que contienen sustancia P y también células gabaérgicas en el control de la liberación de AChE. Así, la estimulación del estriado podría evocar la liberación de la AChE de la sustancia nigra ya sea ortodrómicamente por activación de eferentes que contienen sustancia P (Hong y

Col. 1977) (es sabido que sustancia P produce un aumento en el disparo de células nigrales (Walker y col., 1976), o por activación antidrómica de neuronas nigrales que contienen AChE.

En dos estudios sucesivos (Greenfield y Col. 1980) y (Greenfield y Shaw 1982) continuaron estudiando este interesante tema pero ahora con el uso de cánulas Push-pull, lo que permite obtener niveles simultáneos de esta enzima en ambas SNs y ambos NCs. En el primer trabajo estudiaron la liberación de AChE y de 3H-Dopamina (DA) recién sintetizada (a partir de 3H-TIR). Estos autores mostraron que la liberación espontánea era relativamente constante ($\pm 10\%$ de niveles basales) en ambas estructuras y que además las concentraciones eran bastantes similares. Cuando estimularon químicamente con K^+ (30 mM) por 10 minutos en una SN, encontraron que en la SN estimulada y en el NC contralateral se producía un aumento en los niveles de AChE, en cambio en la otra SN y en el NC ipsilateral los niveles de AChE disminuyeron. También observaron que esta manipulación no produjo cambio alguno en los niveles de la enzima colinesterasa no específica (C-NS) ni en la LDH durante toda la perfusión, incluyendo el período de la estimulación química. En relación a la liberación de 3H-DA producto de la estimulación con alto K^+ , se encontró un aumento en la liberación en ambos NCs, pero en el contralateral a la SN estimulada la elevación fué muy leve. Interesantemente esta estimulación produjo además una elevación en la liberación de 3H-DA en la SN no estimulada.

Estos resultados tomados en conjunto sugieren que existe una independencia para la liberación de AChE y 3H-DA en esas estructuras. Es posible por tanto que el origen de la AChE sea adicionalmente o exclusivamente de otras neuronas no dopaminérgicas o que los mecanismos de liberación en estas células sean diferentes.

Estudios que han involucrado el uso de neurotoxinas (6-hidroxi-dopamina (6-HD) y ácido kainico) han mostrado que a pesar del alto contenido de AChE en neuronas dopaminérgicas estriatales, éste parece no ser el único lugar de origen. 6-HD que produce al menos un 90% de disminución de la tirosina hidroxilasa (TH) (Lehmann y Fibiger, 1978), disminuye la actividad de la AChE en solo un 43%. Así mismo ácido kainico redujo en un solo 44% la actividad de AChE, a pesar de que destruye totalmente las neuronas dopaminérgicas. Estos datos sugieren que otras neuronas aferentes que llegan al estriado serían responsables también de los niveles de AChE encontrados en este sitio.

De los datos recién mencionados parece claro que la AChE puede ser liberada en el SNC a través de procesos que involucren actividad neuronal. Esto, a pesar de que el origen de la AChE tanto de la SN como del NC aún no haya sido dilucidado.

En el otro trabajo (Greenfield y Shaw, 1982) estudiaron los efectos de la infusión de D-anfetamina (10-6 M) en una SN sobre la liberación de AChE y aminopeptidasa en las cuatro estructuras ya mencionadas.

En esta oportunidad se obtuvieron también liberaciones espontáneas de AChE en ambas estructuras. Tampoco en esta ocasión hubo cambios en la LDH y C-NS. La aplicación de D-anfetamina a una SN produjo un aumento en la liberación de AChE y aminopeptidasa localmente y en las dos estructuras contralaterales pero se observó una disminución de la liberación espontánea de AChE en el NC ipsilateral.

A pesar de que ambas enzimas se liberan en forma paralela de las estructuras mencionadas por la aplicación de anfetamina, es claro que el sustrato celular y sus mecanismos de liberación son distintos. AChE se detecta constantemente al parecer como parte de un proceso espontáneo de liberación tónico y en cambio la aminopeptidasa se detecta solamente cuando se evoca producto de una estimulación química.

Se ha sugerido ya en varias ocasiones que la AChE soluble se libera de neuronas centrales y más específicamente de neuronas de la SN que son activadas. Sin embargo resulta paradójico que la anfetamina produzca un aumento en la liberación de esta enzima sabiendo que este fármaco tiene un efecto inhibitorio sobre la descarga neuronal de células de la pars compacta (Aghajanian y Bunney, 1973).

Podrían existir quizás dos posibles explicaciones a este fenómeno. Una es que la liberación de AChE pueda originarse en células que no sean dopaminérgicas las cuales serían excitadas cuando estas fueran inhibidas por anfetamina. Sin embargo esta posibilidad es dudosa ya que trabajos histoquímicos (Butcher y Col, 1975) han mostrado que una gran parte sino toda al AChE de la pars compacta se encuentra

confinada a cuerpos celulares y dendritas de neuronas dopaminérgicas.

La otra posibilidad es que el gatillo último para la liberación de la AChE no sea la descarga eléctrica sino más bien la dopamina por si misma. En otras palabras que sea dependiente de la liberación de dopamina solamente y no de la actividad celular. Aquí se haría notar la diferencia de lo que ocurre en condiciones fisiológicas en que la descarga eléctrica produce la liberación de AChE y de DA, lo que hace difícil atribuir esta liberación a la actividad celular o a la liberación del neurotransmisor. En cambio la manipulación farmacológica con amfetamina que remueve la dopamina endógena independientemente de la actividad neuronal, permite diferenciar entre estos dos eventos. (Raiteri y Col. 1975). Se ha sugerido además que la DA no se almacena en vesículas en dendritas de la pars compacta (Wassef y col, 1981) y es posible que se encuentre mas bien en los reticulos endoplásmicos rugoso y liso (Mercer y col., 1979). Es posible por tanto que la amfetamina produzca la liberación de ambas moléculas (AChE y DA), del RE de dendritas de forma paralela. Si esto fuera así, implicaría quizás que la AChE no sería degradada tan rápidamente como la DA y en base a su similitud en la forma de acción (DA y AChE exógena inhiben a las células de la pars compacta (Greenfield y col., 1981) sería posible que la AChE así liberada amplificaria la señal dopaminérgica. Si esta hipótesis se verifica, sería posible que ésta enzima y otras, quizás actuando de igual manera en

otros sistemas de neurotransmisores, serían clasificadas como verdaderos neuromoduladores.

Ultimamente y continuando con su línea de trabajo Greenfield y col, 1983a publicaron un importante trabajo sobre liberación de proteínas totales, AChE y C-NS en el gato anestesiado. Al igual que en trabajos anteriores, se usaron 4 cánulas push-pull (2 para los NSs y 2 para las NSs) simultáneamente. Primero analizaron las liberaciones espontáneas de estas proteínas y mostraron que tanto los niveles de AChE, C-NS y proteína total liberada de los NCs no difieren significativamente (aunque sí son un poco menor, especialmente los de proteína total) que los niveles obtenidos en ambas SNS. En segundo término observaron que la omisión de Ca^{++} del medio de perfusión, no produjo ningún efecto significativo sobre los patrones de liberación espontánea de estas proteínas.

En base a las actividades de las enzimas colectadas en los perfusados hicieron una estimación de las concentraciones y obtuvieron que la AChE podría representar solo el 0.0015-0.0038 % del total protéico recolectado. Cuando se le suman las otras dos proteínas (C-NS y LDH) estos valores llegan a representar solo un 0.02-0.05 % de la proteína total liberada.

También estudiaron el efecto del alto K^+ (30 mM) sobre la liberación de estas proteínas y mostraron que tanto la proteína total como la AChE aumentaron en un 103 y 64% respectivamente, sobre los niveles basales. Los niveles de C-NS y LDH no cambiaron producto de esta manipulación. Cuando

se omitió el Ca^{++} en estas estimulaciones con alto K^+ , se observó que el aumento de liberación de AChE fue totalmente abolido, en cambio para las proteínas totales la abolición fue solo parcial. Cuando se usó 100 mM de K^+ , los niveles de C-NS no se modificaron. Además, los niveles de AChE y proteínas totales tampoco cambiaron (en comparación con 30 mM) aunque el aumento de AChE fue más prolongado. (Se mantuvo en un mayor número de colecciones).

Cuando estudiaron los efectos de la estimulación eléctrica de una SN sobre los niveles de liberación en las 3 estructuras restantes, observaron en primer lugar que la C-NS no se modificó en ninguno de los sitios mencionados. La liberación de AChE disminuyó y la proteína total no cambió en el NC ipsilateral. En el NC contralateral los resultados mostraron un aumento en los niveles de AChE y proteínas totales, pero el aumento de la proteína fue mayor. Al observar lo ocurrido en la SN contralateral, se observó una disminución tanto en la liberación de AChE como en proteína total y este hecho se reflejó tanto en la magnitud como en la duración del evento. Los interesantes resultados obtenidos en este estudio sugieren que: 1) La liberación de algunas proteínas del SNC ocurre de manera espontánea. 2) La manipulación por medio de factores depolarizantes produce la liberación de algunas pero no de otras proteínas de este sistema. Este hecho sugiere que existen cuando menos dos poblaciones de proteínas liberables distintas del sistema nervioso. Un grupo que incluiría a proteínas liberadas

dependiendo de la actividad neuronal y otro grupo cuya liberación parece ser independiente de la actividad nerviosa.

3) Ya que en este estudio la omisión de Ca^{++} no afectó la liberación espontánea de proteínas y considerando que en esta misma preparación se ha demostrado una dependencia de Ca^{++} para la liberación espontánea de NT, (Cheramy y Col, 1981; Hery y Col, 1979) sugiere que los mecanismos de liberación espontánea de proteínas y NTs son diferentes.

4) Los efectos de Ca^{++} en la liberación evocada de AChE de la SN, sugieren fuertemente que el origen de esta enzima es neuronal. Por otro lado ya que la estimulación con K^{+} en ausencia de Ca^{++} no produjo que los niveles de proteínas totales llegaran a niveles significativos, sugiere que existen cuando menos dos poblaciones proteicas que se liberan de células nerviosas por estimulación depolarizante; una dependiente y otra independientes de la presencia de Ca^{++} para su liberación.

5) Por otra parte resulta claro que no todas las proteínas liberadas tienen un origen neuronal. Aunque a la fecha no se conoce la identidad celular de otras proteínas existe la posibilidad de que contaminación con materiales no proteicos (que reaccionan al LOWRY (Chou y Goldstein, 1960; Bensadoun y Weinstein, 1976), incrementan de manera artificial los valores proteicos totales de los perfusados. Resulta también evidente que la identificación de estas proteínas permitirá resolver muchas dudas en relación al origen de las mismas. Desgraciadamente otra vez nos topamos con problemas metodológicos ya que si AChE representa solo un 0.04 % del total proteico, difícilmente se podrá distinguir o detectar

en una cromatografía líquida de alta presión o por patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida, incluso con los de dos dimensiones. Quizás la alternativa sería la detección por medio de sensibles métodos enzimáticos o inmunológicos. En los últimos trabajos de Greenfield y colaboradores ya mencionados, se ha sugerido en diversas ocasiones que el origen de la acetilcolinesterasa liberada al líquido extracelular ya sea espontáneamente o evocada por algún factor depolarizante, parece no residir en neuronas colinérgicas sino más bien en neuronas dopaminérgicas. Existen además también varias evidencias que sugieren que la función de esta AChE (la isoenzima V) tendría otra función distinta de la hidrólisis de acetilcolina.

1) Se ha demostrado que la AChE soluble se almacena independientemente de la acetilcolina en el retículo endoplasmático liso. (Jessen y Col, 1978)

2) De las cinco isoenzimas solubles de AChE, solo una (isoenzima V) es específicamente liberada, (Chubb y col, 1976).

3) La isoenzima V tiene la misma movilidad electroforética que la AChE encontrada en el líquido cefalo raquídeo, (Chubb y col, 1976).

4) Hoy ya no se acepta la AChE como un buen marcador histológico de inervación colinérgica. (Silver, 1974).

5) La liberación de AChE de neuronas centrales no es modificada por agonistas o antagonistas colinérgicos. (Greenfield y Smith, 1979)

6) Desde el punto de vista anatómico la sustancia nigra es un buen sitio para mostrar que la AChE liberada de esta estructura no está ligada a la actividad colinérgica ya que:

- a) Existe un desproporcionado exceso de AChE en relación a la mínima cantidad de acetilcolina y su enzima sintetizadora la colín acetiltransferasa (Silver, 1974).
- b) La localización de AChE está muy asociada a la dopamina nigral ya que se encuentra principalmente en células dopaminérgica de la pars compacta y además se desarrolla en paralelo con este neurotransmisor en el curso de la ontogenia, (Butcher y Hodge, 1976).
- c) La AChE del líquido extracelular parece tener una acción directa sobre el disparo de las células dopaminérgicas independientemente de la hidrólisis de la acetilcolina, (Dray, 1979).
- d) Es posible que la AChE de origen dopaminérgico tenga una función en la transmisión peptídica ya que se ha mostrado en experimentos in-vitro que es capaz de hidrolizar sustancia P y encefalinas, (Chubb y Col, 1980).
- e) La liberación de AChE de la sustancia nigra ha sido demostrada indirectamente in-vitro e in-vivo, (Cuello y col, 1981).

Con el objeto de evidenciar con mayor claridad el origen de AChE y otras enzimas liberables del SNC, Greenfield y col 1983b, realizaron lesiones en la vía nigro-estriatal con 6-HD y estudiaron los efectos sobre la liberación espontánea e inducida de AChE, C-NS, amino-peptidasa (A-P) y LDH con la misma metodología de sus estudios anteriores.

Los resultados mostraron que esta lesión produjo una disminución de la liberación espontánea de las enzimas en

cuestión, tanto en el NC como en la SN. La estimulación con alto K^+ produjo un aumento en la liberación de AChE, A-P y LDH localmente (SN) y una disminución de la liberación de estas tres enzimas en el NC en animales controles (sin lesión). Sin embargo, la estimulación con alto K^+ no produjo tales cambios cuando los experimentos se realizaron en animales lesionados. Vale la pena mencionar que parte de estos resultados ya entran en contradicción con resultados anteriores del mismo grupo en los cuales la enzima aminopeptidasa no se liberaba espontáneamente sino que su liberación se podía evocar solamente con agentes depolarizantes (Greenfield y Shaw, 1982 p. 2891).

Sobre la enzima LDH estos resultados son aún más sorprendentes ya que justamente esta enzima se ha usado en la mayoría de estos experimentos como marcador de lesión tisular debido a que en condiciones normales no solo no se libera espontáneamente, sino que se ha demostrado que estimulaciones con alto K^+ no producen una liberación de esta enzima al LCR (Greenfield y col., 1980). Sin embargo estas diferencias podrían tener su origen tanto en la sensibilidad del método usado para su medición, como en una diferencia de especies. También estos resultados podrían ser indicio de la existencia de algún tipo de LDH y de amino-peptidasa de origen no citoplasmático. Sin embargo, los autores no lo mencionan y ni siquiera discuten la posibilidad de que sea daño celular el causante directo de los niveles debetados de estas dos enzimas.

Un dato nuevo interesante encontrado en estos experimentos fue la buena correlación entre niveles de LDH y A-P en todas las fracciones ya sean previas o durante la estimulación química. (el coeficiente de correlación varió de 0.83 - 0.93). Este hecho hace pensar que no solo la liberación parece llevarse a cabo de forma paralela sino que es posible que además compartan un sitio de almacenaje común.

Ya que la estimulación con K⁺ en la SN de animales controles produce niveles de AChE nada despreciables en los perfusados (hecho que desaparece en animales lesionados) sugiere fuertemente que una gran parte de la enzima liberada tenga su origen en células dopaminérgicas de la pars compacta.

En un intento por describir una función distinta de esta enzima, Greenfield y col., 1984 investigaron el efecto de inyecciones de AChE en la Sustancia Nigra de la rata.

Estos autores mostraron que posterior a la inyección de la enzima, amfetamina administrada i.p. evoca la conducta de giro en dirección contralateral al sitio de inyección.

Además mostraron, que la purificación de la AChE con movilidad electroforética similar a las formas que se liberan, fue más potente en evocar tal conducta. Interesantemente, dependiendo de la cantidad de enzima administrada inicialmente, los efectos conductuales, producto de una sola inyección podían mantenerse por más de 30 días. Con estos resultados, los autores concluyen que la AChE liberable tiene una función importante en la SN, independientemente de la actividad colinérgica y quizás ejerciendo cambios a largo plazo que involucran probablemente

modificaciones de los receptores dopaminérgicos estriatales.

En otro pequeño reporte Greenfield y Weston, 1984 muestran que la liberación de AChE en el NC es aumentada por haloperidol e inhibida por amfetamina, dato que sugiere que esta liberación es reflejo del disparo de células nigro-estriatales. Sin embargo, ya que ambas drogas evocan una liberación local de AChE en la SN, pero inhiben el disparo celular, sugiere que la liberación de la enzima en la SN es independiente del disparo neuronal.

Chubb y col, 1983a describieron algunas evidencias que señalan que AChE posee características suficientes como para denotar a esta enzima como un gran "neuropéptido": 1) Existen suficientes evidencias que muestran que la AChE no está concentrada solamente en el espacio sináptico, sino que cantidades significativas se encuentran almacenadas intracelularmente. La enzima se encuentra en el RE en el soma, axón y en el aparato de Golgi. Es importante señalar que estas células incluyen células endócrinas y también neuronas no colinérgicas; 2) Parte de esta enzima existe en formas solubles y fácilmente extraíble de homogenados; 3) Existen (como se ha mencionado detalladamente) fuertes evidencias que señalan que AChE es secretada de distintas células, tanto en la periferia como en el SNC. La liberación de neuronas y de células endócrinas es inducida por estimulación y dependiente de Ca^{++} . Además, la forma molecular que se libera es específica, a pesar de que existen otras cinco diferentes formas moleculares; 4) La aplicación

exógena de AChE que se lleva a cabo en la SN produce una inhibición marcada del disparo celular y además es capaz de evocar la conducta de giro cuando se inyecta unilateralmente; 5) Se ha mostrado claramente su actividad de peptidasa, por la habilidad de hidrolizar encefalinas y sustancia P; 6) La concentración de AChE varió marcadamente con la actividad fisiológica de neuronas de la retina del pollo y estos cambios fueron paralelos a los encontrados con encefalinas. Estas evidencias sugieren que AChE es almacenada y liberada de neuronas y que posee un efecto fisiológico en células efectoras. Por tanto, existen más evidencias de que AChE sea un neuropéptido que para la mayoría de los otros más populares candidatos.

Para finalizar esta descripción de estudios sobre la liberación de AChE de células nerviosas, quisiera mencionar que recientemente Weston y Greenfield, 1986., sugirieron que la liberación de la enzima de estriado, estaría relacionada con la frecuencia de disparo de neuronas nigrostriatales, pero que la liberación de AChE en la sustancia nigra, que probablemente sea liberación de dendritas, es independiente de potenciales de acción mediados por Na^+ , pero probablemente asociado con conductancias dendríticas específicas de Ca^{++} . Por otra parte, Small y col, 1986., mostraron fuertes evidencias que señalan que AChE posee una actividad peptidasa similar pero no idéntica a Tripsina. Estos autores mostraron que AChE hidroliza Cromogranina A (una de las principales proteínas solubles, encontradas en células cromafines de la médula de la glándula adrenal) para

producir diferentes polipéptidos de peso molecular menor. Este reporte es una complementación a un reporte previo de este grupo (Chubb y col., 1980) en el cual mostraron que AChE purificada tiene la capacidad de producir encefalinas, a través de la hidrólisis de su molécula precursora e hidrolizar Sustancia P.

Resumiendo, se podría decir que hasta la fecha se ha acumulado un número nada despreciable de evidencias, que sugieren que AChE no solo se liberaría de células nerviosas al parecer de manera espontánea pero también evocada por actividad sino que además pareciera que más que hidrolizar a ACh, esta enzima tendría la capacidad de hidrolizar diferentes moléculas precursoras de una variedad aún no totalmente conocida de neuropéptidos.

B.- DOPAMINA β - HIDROXILASA.

Una de las características de los gránulos cromafines de las células de la médula de la glándula adrenal, es que un 77 % de la proteína total es liberado por lisis de la partícula. La proteína Cromogranina A (Crom A) representa aproximadamente un 40 % del total proteico soluble (Winkler y Smith, 1975). La enzima dopamina - β - hidroxilasa (DBH) representa también otro porcentaje importante del total proteico soluble de estos gránulos (Viveros y col, 1968). En 1965, Banks y Hallie mostraron por primera vez que Crom A

se encuentra en perfusados de glándulas adrenales estimuladas y ausente en glándulas adrenales no estimuladas eléctricamente. Posteriormente, Viveros y col, 1968, mostraron también que la DBH se libera por estimulación de la glándula adrenal.

Ambas proteínas se encuentran también en vesículas noradrenérgicas del nervio esplénico y lisis de estas vesículas produce que la mayor parte de la Crom A (De Potter y col, 1970) y hasta un 20 % de la DBH (Horthagl y col, 1969) se detecta como proteína soluble.

La demostración de que en perfusados de Bazo, colectados durante la estimulación del nervio esplénico posibilita la detección de ambas proteínas, no tardó en llegar. (De Potter y col, 1969; Gewirtz y Kopin, 1970; Geffen y col, 1969).

Uno de los hallazgos que proporcionó quizás una de las mas convincentes evidencias sobre el origen de ambas proteínas en el nervio esplénico, fue dada por Smith y col, 1970. Estos autores mostraron la correlación entre las cantidades de DBH, Crom A y Noradrenalina (NA) liberada por la estimulación del nervio en perfusados del Bazo de becerro. El coeficiente de correlación para DBH y NA fué .95, y para Crom A y NA fué de .92 . Ya que no hay duda que NA se libera del nervio, se puede concluir con bastante certeza que DBH y Crom A se liberan junto con el neurotransmisor de las terminales nerviosas del nervio esplénico.

La pregunta es ahora: Cómo se liberan estas proteínas?

Estudios sobre la composición de fracciones subcelulares de axones del nervio esplénico han mostrado que DBH y Crom A son

componentes de vesículas noradrenérgicas (vesículas grandes y densas). Otros estudios con microscopía electrónica (Fillenz, 1971) han reportado evidencias que muestran la fusión de la membrana de estas vesículas con la membrana de la células nerviosas en el vas deferens. Por otra parte ya De Potter y col, 1969 y Smith y col, 1970., habían demostrado que la liberación de ambas proteínas del nervio esplénico de becerro, era dependiente de la presencia de Ca^{+2} en el medio de perfusión.

Aunque aún existen muchas interrogantes sobre el exacto mecanismo de liberación de la DBH y también de la Crom A, las evidencias mostradas parecen indicar que el proceso de exocitosis, parece ser el mecanismo por el cual estas proteínas se liberarían al medio extracelular.

XIII.- TRANSFERENCIA DE PROTEINAS GLIALES HACIA EL AXÓN

Los últimos años han aparecido algunos reportes que sugieren que el axón recibiría proteínas provenientes de la glía que lo rodea, las cuales podrían cumplir una función muy importante para el mantenimiento y función del axón. Quizás las evidencias mas importantes vienen de estudios en el cangrejo de río en el cual ciertos axones de neuronas motoras sobreviven y se mantienen funcionalmente activos por meses

después de que se han dañado sus cuerpos neuronales. La sobrevivencia de esos axones se correlaciona de manera directa con una hipertrofia de la glía que los rodea y al parecer este proceso permite que los niveles de la enzima Descarboxilasa del Acido Glutámico (GAD) en los axones se mantengan estables. (Sarne y col,1976a,b).

Por otro lado gracias al gran diámetro (0.5 mm) del axón gigante del calamar, que permite la retracción mecánica de la glía que lo rodea se ha posibilitado un análisis separado de estos dos compartimentos. La incubación de axones (separados de su soma) en un medio que contenga amino-ácidos radioactivos, resulta en obtención de proteínas marcadas en la glía y en el axoplasma.

Como ya vimos (a pesar de los estudios de Koening) evidencias tales como: ausencia de la maquinaria sintética de proteínas (ribosomas y ARNr), axoplasma aislado de la glía que no incorpora amino-ácidos radioactivos a proteínas y el hecho de que inyecciones de ARNasa en el axón, no reduce la aparición de proteínas recién sintetizadas (Lasek y col,1974) parecen sugerir que el fenómeno de transferencia proteica de glía a neurona es factible. Corroborando esta hipótesis Lasek y col,(1977) mostraron que una fracción sustancial de las proteínas gliales (40 %) son transferidas al axón y comprenden proteínas heterogeneas de P.M. en el rango de 12K--200K daltons. Estos autores además mostraron que el ión Ca^{++} esta involucrado de manera muy importante en este proceso. El reemplazo de Ca^{++} por Mg^{++} o Co^{++} reduce significativamente esta transferencia.

Recientemente Tytell y Lassek, 1984 con un análisis detallado en electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) reportaron la transferencia de 16 polipéptidos mayores y 80 polipéptidos menores de la glia al axón. La mayoría de estas proteínas transferidas de glia (PTG) resultaron ser distintas de las proteínas sintetizadas por el cuerpo celular del axón gigante del calamar. Estas evidencias sugieren fuertemente que las proteínas transferidas del elemento glial podrían poseer una función radicalmente diferente de las proteínas enviadas del cuerpo celular.

La pregunta que naturalmente surge es: cómo se lleva acabo esta transferencia? La manera mas simple sería quizás que el axón, por medio de algun proceso endocitótico, incorporara las proteínas que han sido liberadas al espacio extracelular por la glia. Sin embargo algunas evidencias parecen indicar que el mecanismo de transferencia es quizás algo mas complejo.

Gainer y col 1977, incubaron axones con ¹⁴C-BSA en el medio extracelular y mostraron que la cinética de captura de esta proteína por el axón era totalmente diferente a la cinética de aparición de proteínas transferidas por la glia. Además el patrón electroforético de las proteínas liberadas por la glia al medio de incubación es diferente de las transferidas al axón. Otras observaciones muestran que la mayoría sino todas las proteínas transferidas al axón se encuentran en el axoplasma en forma estructural (Tytell y Lassek, 1981).

Gilbert y col, 1982 mostraron además que vesículas intactas pasan de la glia al axón.

Estas evidencias aunque indirectas parecen sugerir que quizás exista otro mecanismo, probablemente más específico que un proceso general de endocitosis, el cual transfiera proteínas de la glia al axón.

Tytell y Lasek, 1984 propusieron que esta transferencia es reflejo de un fenómeno de fagocitosis de pequeñas porciones de células gliales por el axón.

Por otra parte Ferrachia, 1981 mostró evidencias de que por lo menos en el cangrejo de río, existen regiones especializadas de continuidad citoplasmática entre la glia y el axón. Junto con esto Goldstein y col 1982, mostraron que la transferencia también exista en dirección opuesta (del axón a la glia) por tanto, la existencia de "canales citoplasmáticos" que permitan la transferencia de materiales bidireccionalmente, resulta una manera lógica de explicar esta transferencia.

Ya que la cantidad de proteínas que el axón recibe de la glia es bastante pequeña, (la mayoría de éstas no se detectan cuando se colorea una muestra de 0.5-2.0 μ l de axoplasma, en el análisis de 2D-PAGE), pareciera indicar que más que complementar el abastecimiento proteico del soma, estas proteínas tendrían funciones específicas importantes tales como funciones tróficas y/o de soporte en condiciones adversas. Recientemente se ha demostrado que el aumento de la temperatura induce una mayor transferencia de proteínas gliales (las cuales tienen un P.M. y un P_i similar a las

proteínas de "stress" o proteínas de "alta temperatura") hacia el axón lo cual sugeriría que estas proteínas podrían ayudar al axón a sobrevivir en "momentos difíciles".

Sin embargo quiero recalcar que aunque este proceso de transferencia puede ser muy importante para la mantención estructura y función del axón, no cabe duda que la mayoría de las proteínas que se encuentran en el axón provienen del soma celular, el sitio más importante para la síntesis proteica cerebral.

XIV.- TRANSFERENCIA TRANSNEURONAL DE PROTEINAS.

En el capítulo anterior, se analizaron diversos estudios que sugieren la existencia del fenómeno de liberación de proteínas tanto en sistemas in-vitro como in-vivo. En el presente capítulo analizaremos otros estudios que sugieren la existencia del fenómeno de transferencia transneuronal de proteínas y otras moléculas. La transferencia transneuronal es pertinente al tema ya que requiere de una externalización, sino liberación del producto proteico.

A.- ESTUDIOS EN EL SISTEMA VISUAL

Indudablemente, el sistema visual tanto de vertebrados

como de invertebrados ha sido una de las preparaciones más usadas en el estudio de la transferencia transneuronal de compuestos radiactivos. Neale y col. (1972) usaron a la carpa como animal experimental y por medio de inyecciones intraoculares de ^3H -PRO y subsecuentemente por radioautografía del tectum óptico, mostraron que gránulos plateados se encuentran unilateralmente en el tracto nervioso que contiene fibra eferentes del tectum óptico, lo que sugiere fuertemente la existencia de migración intercelular de moléculas marcadas. Los autores usaron ^3H -PRO ya que en trabajos previos probando 18 diferentes aminoácidos en su capacidad de incorporarse a proteínas sintetizadas en células ganglionales de la retina, encontraron que ^3H -PRO y ^3H -ASP fueron más eficientes que ^3H -LEU en incorporarse a proteínas que aparecieron en el tectum óptico contralateral (TOC). (Elam y Agranoff, 1971). En el presente trabajo los autores analizaron la radioactividad encontrada en las diferentes láminas celulares del tectum, encontrándose la mayor cantidad de radioactividad en niveles que reciben directamente terminales del tracto óptico. Además, también se encontró radioactividad en las fibras del tectum contralateral al ojo inyectado, lo que sugiere un movimiento transináptico de moléculas marcadas. Sin embargo cabe la posibilidad de que la radioactividad encontrada en el lado contralateral sea consecuencia de algún tipo de difusión inespecífica de la marca.

Independientemente de como llegó la marca a las fibras eferentes, es importante comprobar (este punto es además

válido para todos los otros estudios que muestran traspaso transneuronal de radioactividad) si lo que ha pasado son proteínas marcadas, péptidos que contienen la marca radioactiva o es el solo el aminoácido libre. Para comprobar este punto usaron un inhibidor de síntesis proteica, Acetoxicicloheximida el cual inyectaron intracranealmente para bloquear la síntesis proteica local. Los resultados mostraron que a pesar de este bloqueo, las fibras eferentes del TCC continuaron marcadas. Estos datos según los autores sugieren que son las macromoléculas marcadas las que se transportan por migración transináptica o por algún otro mecanismo de paso transmembranal. Nótese que los autores asumen que la marca radioactiva esta incorporada a proteínas, pero el uso de inhibidores de síntesis proteica lo único que puede asegurar es que no hubo síntesis "de novo". Es por tanto posible que la marca radioactiva encontrada sea parte de algún producto de degradación proteica o incluso el mismo aminoácido radioactivo. En relación al paso transináptico de proteínas, que también ha sido discutido en trabajos previos, mencionan que es posible que el uso de ^3H -Leu en algunos estudios sea el factor que oscurezca la pequeña cantidad de proteínas marcadas que ha migrado interneuronamente. Los autores terminan sugiriendo que esta técnica puede ser muy útil para la elucidación de conexiones neuroanatómicas en el sistema visual.

En 1972, A. Hendrickson usó microscopía de luz y electrónica para localizar componentes lentos y rápidos del

transporte axoplásmico que llegan al núcleo geniculado lateral (NGL) del mono, posterior a la inyección de ^3H -LEU, en el humor vitreous del ojo. Los resultados mostraron que tres días posterior a la inyección, un 53% de los granos plateados encontrados en el NGL se localizó en terminales sinápticas de la retina y el 27% se encontró en los axones. A los 30 días posterior a la inyección, la figura cambió encontrándose un 66% de los granos en los axones retinales y sólo un 21% en las terminales sinápticas. El hecho interesante es que tanto a los tres como a los treinta días posterior a la inyección, la cantidad de radioactividad encontrada en neuronas post-sinápticas a los axones retinales radioactivos, mostró ser de niveles mayores que la radioactividad de neuronas del NGL en aquellos estratos que no reciben aferentes del ojo inyectado. Estos resultados además de indicar que la fase de transporte rápido esta principalmente confinada a la terminal sináptica, a diferencia de la fase de transporte lento, cuyas moléculas se localizan fundamentalmente en el axón, muestra por medio de otra técnica, la factibilidad del movimiento transináptico en neuronas centrales.

Usando también la vía visual, Grafstein, 1971 en un elegante estudio, mostró el paso transneuronal de sustancias radioactivas (presumiblemente de naturaleza protéica) en el SNC. A través de la inyección de ^3H -PRO en la cámara posterior de uno de los ojos, mostró que a partir de 8 hrs posterior a la inyección, una cantidad consistentemente alta de material radioactivo precipitable por TCA (probablemente

protéico), empieza a aparecer en la corteza visual contralateral al ojo inyectado. La acumulación de proteínas marcadas se confinó casi en su totalidad a la corteza contralateral. En el lado ipsilateral la radioactividad fué de un sólo 10% del contenido en la corteza contralateral. Cuando se cuantificó la cantidad de marca que apareció en la corteza en relación a lo que apareció en el NGL se constató que sólo un 2% de la marca que llega al NGL llega posteriormente a la corteza. Las evidencias mencionadas son difíciles de explicar a menos que se asuma la transferencia transneuronal de sustancias radioactivas primero hacia el NGL y posteriormente a la corteza. Existen sin embargo algunas explicaciones alternativas aunque todas ellas muy poco probables. Una vía directa de la retina a la corteza (que no ha sido descrita) podría explicar la marca en la corteza pero no la encontrada en el NGL. Una vía extracelular desde el NGL a la corteza no explicaría el porque la marca se confina en la corteza visual. Un transporte retrógrado a lo largo de las células corticales que terminan en el NGL podría ser otra explicación pero ésta resulta altamente improbable. Aunque estas explicaciones alternativas existen de forma teórica, las evidencias experimentales las hacen considerar poco probables. El paso siguiente sin duda, es determinar si lo transportado son macromoléculas o sus productos de degradación y verificar si existió o no síntesis protéica en el elemento postináptico.

Grafstein y Laurenco, 1973 continuaron investigando este

fenómeno de transferencia en el sistema visual. Inyectaron 3H-FRU en ojo del ratón y observaron que 5 horas posterior a la primera señal de proteínas marcadas en el NGL, la marca empezó a aparecer también en la corteza visual. La proporción de la marca que llegó a la corteza relativa a la llegada al NGL aumentó con el tiempo. Ya que compararon este proceso en ratones normales, con una especie mutante que no posee receptores visuales (y que por tanto la actividad eléctrica se encuentra reducida) y no obtuvieron diferencias, parece sugerir que este fenómeno es independiente de la actividad eléctrica. Ya que fucosa fue el mejor precursor en estos estudios, sugiere fuertemente que son glicoproteínas las sustancias transportadas. Los autores finalizan diciendo que al parecer existe una transferencia constante de proteínas marcadas desde axones del nervio óptico hacia elementos neuronales de su vecindad.

Specht y Grafstein en 1973 reportaron más evidencias sobre la transferencia de moléculas marcadas (de naturaleza protéica) en la vía visual del ratón. Esta vez la inyección de 3H-Fucosa en el ojo izquierdo produjo la aparición de marca radioactiva en NGL derecho y en el Colículo Superior. Alrededor de un 10% de la marca encontrada en el NGL apareció posteriormente en la corteza visual derecha, posteriormente, pero más radioactividad se encontró en la corteza retrosplenial que se ubica dorsal al colículo marcado.

Cuando bloquearon el braquium del colículo superior derecho, no llegó marca al colículo y la marca en la corteza retrosplenial disminuyó en un 85%, pero la marca en la

corteza visual no fue alterada. Más aún, la marca en la corteza visual se concentró principalmente en la Lámina IV (que recibe la mayor innervación del NGL). Estos resultados sugieren otra vez la existencia de transferencia transneuronal desde la retina hacia la corteza visual, vía núcleo geniculado lateral. Además, estudiaron el efecto de Cicloheximida y observaron que este tratamiento no afectó la acumulación de marca en la corteza visual. Sin embargo, la proporción de marca en la corteza, en relación a lo aparecido en el NGL se redujo. De esta manera, cabe la posibilidad de que sean macromoléculas las responsables de este traspaso de radioactividad en la vía visual.

En otros dos estudios paralelos, Wiesel y col., 1974 y Drager, 1974 corroboraron los resultados del grupo de Grafstein y cols. Wiesel y col. inyectaron una mezcla de PH-PRO-FUCOSA en el ojo de monos macacos resus. Al cabo de diez días y posterior al sacrificio, se estudió por medio de autoradiografía la marca en la corteza visual y se observó que las columnas de dominancia ocular correspondiente al ojo inyectado, se marcaron densamente. Estos resultados, no solo demuestran el traspaso de marca en el NGL, sino que además muestran que este proceso ocurre exclusivamente en la lámina del geniculado que recibe aferentes del ojo inyectado.

Por su parte, Drager mostró también que la lámina IV de la corteza visual es la que presenta mayor marca en ratones pigmentados comparados con ratones albinos. Además, su trabajo sugiere que este mecanismo de transporte

transneuronal no se limita a la vía retino-geniculo-cortical, sino que la vía tecto-parabigeminale del puente, parece también mostrar la existencia de este fenómeno.

B.- ESTUDIOS EN LOS SISTEMAS VESTIBULAR Y AUDITIVO

Como ya se ha mencionado, el transporte transneuronal de precursores de proteínas y glicoproteínas ha sido extensamente observado en el sistema visual, no sólo de roedores sino que también en mamíferos. Además, este fenómeno ha sido también observado en la unión neuromuscular y en el sistema olfatorio (Barber y col., 1978). En 1972, Alvarez y Puschei, trabajando en el sistema vestibular de la carpa y usando radioautografía, pudieron demostrar la transferencia de material marcado radioactivamente (supuestamente material protéico) desde la médula por medio de axones eferentes al neuroepitelio sensorial del laberinto de la carpa. Los autores hacen una minuciosa evaluación de las posibles vías por las cuales el material radioactivo podría llegar a las células epiteliales y concluyen que ni por vía sanguínea, ni por los espacios extracelulares, es posible que este material llegue al sitio donde es encontrado. La vía axonal parece ser la mejor alternativa para explicar estos resultados. De esta forma, los autores concluyen que posterior a la inyección en la médula, los aminoácidos radioactivos son tomados e incorporados intensamente por las neuronas del sitio de inyección.

Algunas de estas neuronas mandan sus axones al laberinto y así el material radioactivo que se mueve a una velocidad aproximada de 15 mm/día llega a las terminales y es transportada a las células epiteliales. Además infieren que estas sustancias podrían representar una señal molecular que lleve consigo información trófica y que a diferencia de los NTs que se quedan en la superficie celular, estas moléculas entrarían a la célula, hecho que aparentemente no produciría un problema, ya que se ha visto que grandes moléculas son capaces de entrar a distintos tipos de células (Klatzo y Miquel, 1960). En dos reportes sucesivos (Carpenter y Cowie, 1985; Cowie y Carpenter, 1985) estudiaron con más profundidad el transporte transneuronal en el sistema vestibular y sistema auditivo de mamíferos. En relación al sistema vestibular, los resultados mostraron la existencia de transferencia transneuronal en casi todas las neuronas del núcleo vestibular que proyectan a niveles más centrales exceptuando la proyección al tálamo. Ya que no existe una buena razón técnica que explique estos resultados, los autores sugieren que la relación sináptica entre aferentes vestibulares primarios y neuronas vestibulares que proyectan al tálamo parece ser diferente de aquellas que conectan a las neuronas vestibulares con otras trayectorias. Si el mecanismo de transferencia transneuronal representa un índice de relaciones sinápticas, ayudaría a entender mejor la existencia de contactos preferenciales de un sitio que proyecta a varios niveles anatómicos secundarios o

terciarios.

Los resultados obtenidos en el sistema auditivo mostraron por una parte que el transporte de ^3H -fucosa (glicoproteinas) fue más prominente que el de ^3H -prolina y que el transporte transneuronal fue mucho más extenso a tiempos comparables en este sistema que en el sistema vestibular. Con similitud a lo observado en el sistema vestibular, no se observó transporte de precursores tritiados hacia el cuerpo geniculado medial ni al braquium del colículo inferior.

A la luz de estos resultados, resulta sugestivo que de alguna manera aún no entendida, la transferencia transneuronal pudiera ser el reflejo de una importante característica funcional del sistema nervioso central.

Estudios en otras preparaciones in - vitro (Globus y col, 1968) e in - vivo (Droz y col, 1973), así como estudios de transferencia transneuronal de Lectinas (Ritchie y col, 1985) y de Anticuerpos (Fabian y Coulter, 1985), demuestran que el proceso de transferencia transneuronal de sustancias neuroactivas es al parecer más importante de lo que anteriormente se pensó, pero sus implicaciones funcionales son aún desconocidas.

XV.- PROTEINAS LIBERADAS DE CELULAS NERVIOSAS CON POSIBLE PARTICIPACION EN EL CONTROL DEL CICLO SUEÑO - VIGILIA.

En 1933, Bancroft y Rutzler sugirieron que, "el sueño puede deberse en parte a una aglomeración irreversible de algunas proteínas en los centros de conciencia". A pesar de que esta hipótesis fue severamente criticada, (Henderson, 1933), fue probablemente la primera vez que se hizo mención del posible papel de proteínas en el sueño. Sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias importantes que sugieren (aunque aún de manera indirecta) la participación de proteínas en el control del ciclo sueño - vigilia, pero de manera particular con el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR).

En 1969, Oswald, sugirió que el rebote de sueño MOR, (situación en la cual los niveles de sueño MOR se encuentran elevados como ocurre típicamente posterior a la privación de esta etapa de sueño.) el cual ocurre durante la abstinencia al alcohol, es reflejo de una fase de reparo neuronal, llevando consigo naturalmente un aumento en la síntesis protéica. Además de esto, propuso que "situaciones las cuales hubiera un aumento de síntesis protéica llevaría a la aparición del sueño MOR".

A partir de las publicaciones de Quabbe, (1966) y

Takahashi, (1968) y confirmado desde entonces por muchos autores; (Parker y col., 1969; Sassin, 1977) se ha reportado que las etapas de sueño 3 y 4 (sueño lento) en humanos (y en especial las correspondientes al primer ciclo sueño lento-sueño MOR) están íntimamente asociadas con los niveles más altos de concentración plasmática de la hormona del crecimiento (HC). Dado que el sueño lento preceda siempre (excepto en enfermos narcolépticos) al sueño MOR, Stern y Morgane, (1977) sugirieron que la HC podría cumplir un papel importante en el desencadenamiento del sueño MOR. Trabajos en los cuales se ha probado el efecto de inyecciones de HC sobre el sueño, ya sea en ratas, (Drucker-Colin y col., 1975a) en gatos, (Stern y Morgane, 1975) y en humanos (Mendelson y col., 1980) han mostrado que la HC produce un aumento dosis-dependiente del sueño MOR. Siendo la HC una hormona cuya función es fundamentalmente anabólica (Korner, 1965; Tata, 1968) es concebible que el aumento de sueño MOR producto de las inyecciones de HC esté directamente relacionado con un aumento en la síntesis de proteínas.

Trabajos neurofarmacológicos han inferido también esta relación entre síntesis protéica y sueño MOR. Por ejemplo, Stern y col., 1972 reportaron un aumento de sueño MOR en gatos dos días después de la administración intra-ventricular de Ciclohexamida. Este aumento (en comparación con el control, antes de la administración de la droga) se mantuvo por más de siete días. Dado que la inhibición de síntesis protéica fue de un 75% en el primer día de la administración

y de un 50% en el cuarto día, estos autores sugirieron que el aumento de sueño MOR podría ser un rebote durante la recuperación de los patrones normales de síntesis proteica. En 1973, Pegram y col., reportaron que la administración subcutánea de ciclohexamida en ratones, disminuye los niveles de sueño MOR solamente durante las primeras 6 horas después de la inyección.

Recientemente Rojas-Ramírez y col., 1977, en ratas, Drucker-Colin y col., (1979a) en gatos, han mostrado una disminución específica de sueño MOR producto de la administración de inhibidores de la síntesis proteica como Anisomicina y Cloranfenicol. Kitahama y Valatx (1975) en ratas y Petitjean y col. (1976, 1979) en gatos han mostrado también que altas dosis de Cloranfenicol reducen selectivamente el sueño MOR durante varias horas después de la administración. Es importante hacer hincapié en que los efectos de estos inhibidores de la síntesis proteica producen su efecto sobre el sueño MOR en forma específica, dado que el sueño lento no fue alterado, excepto a dosis muy elevadas.

Drucker-Colin y col. (1975b) en otra serie de estudios, obtuvieron nuevos datos que apoyan esta relación entre sueño MOR y neuroproteínas. Estos autores usaron gatos implantados con electrodos para el registro electrofisiológico del ciclo sueño-vigilia y con una cánula-guía en la Formación Reticular Mesencefálica (FRM) por la cual se introduce una cánula de "infusión-extracción" (push-pull) para la obtención de "sustancias-activas" del líquido extracelular. Los animales fueron registrados y perfundidos

de forma continua por 12-21 hrs; por cada hora se midió el contenido protéico del perfusado y el tiempo en que el animal permaneció en vigilia, sueño lento o sueño MOR. Los resultados mostraron no sólo que las concentraciones de proteínas del perfusado varían de manera cíclica, sino que los niveles más altos de proteínas correspondieron a los periodos en los cuales el sueño MOR ocupó la mayor proporción del tiempo. Más aún, cuando se compararon las concentraciones de proteínas del perfusado obtenido exclusivamente en vigilia o en sueño MOR, se encontró que de un total de 23 comparaciones, en 21 de ellos los niveles de proteínas fueron significativamente más altos en sueño MOR que en vigilia (Drucker-Colín y col., 1975c). Es interesante mencionar que este patrón cíclico de las proteínas fue abolido como consecuencia de: privación de sueño, lesiones bilaterales en el área preóptica que producen insomnio (Drucker-Colín y Gutiérrez, 1976) y por administración de Cloranfenicol a dosis que específicamente disminuyen el sueño MOR.

En otra línea de evidencias, Roffwarg y col. (1966) sugirieron que el sueño MOR, tendría una función importante en el desarrollo SNC. Esta hipótesis fue parcialmente basada en el hecho de que recién nacidos ya sean bebés u otro animal mamífero, pasan la mayor parte de su sueño diario en etapa MOR (Jouvet-Mounier y col., 1970). Más aún, mientras más inmaduro sea el cerebro al momento de nacer, más sueño MOR ocurre en la etapa postnatal. Por otra parte, Johnson y

Lutges en 1966 habían ya reportado que la síntesis protéica cerebral es alta, los primeros días después del nacimiento. Junto con esto, eventos relacionados con aprendizaje y memoria, los cuales han sido asociados con aumento de síntesis de ARN y proteínas (Uphouse y col., 1974), han mostrado además que producen un alargamiento del sueño MOR (Lucero, 1970).

Estudios de naturaleza bioquímica también han mostrado esta relación entre las proteínas y el sueño MOR. Voronka y col., (1971) mostraron que el contenido protéico de neuronas y neuroglías individuales es mayor en sueño que en vigilia y que deprivación de sueño MOR disminuye este contenido. Brodskii y col., (1974) reportaron que el sueño MOR opuestamente al sueño lento, es acompañado por un aumento de la síntesis de proteínas cerebrales.

Bobillier y col. (1974) mostraron en varios experimentos in vitro que deprivación de sueño MOR en ratas es acompañado por una disminución de la síntesis protéica en el tallo cerebral, con respecto a ratas no deprivadas.

A pesar de que todos estos datos sugieren que las proteínas cerebrales pueden estar relacionados a la regulación de sueño MOR, la evidencia es meramente correlativa; aún más, es difícil según estos datos determinar si la liberación de proteínas es la causa o el efecto del sueño MOR, o simplemente son dos fenómenos que ocurren simultáneamente pero sin una razón de causalidad entre ellos. Una manera de obtener evidencias más directas sobre el papel que proteínas juegan en la regulación del sueño MOR, han sido

los experimentos realizados con Drucker-Colín y col., 1980, quienes han estudiado los efectos de anticuerpos contra componentes protéicos del perfusado obtenido de FRM sobre los distintos parámetros del sueño. Los resultados de estos experimentos han mostrado que, la inyección de estos anticuerpos en la misma FRM producen una disminución significativa del tiempo total de sueño MOR, producto de un aumento en la latencia de aparición y una reducción de la frecuencia más que una disminución en la duración de estos periodos. Fuera de esto, estos autores pudieron corroborar que estos anticuerpos no afectaron al sueño lento ni tampoco a las ondas PGO (Ponto-Geniculo-Occipital) en cambio si redujeron las ráfagas de actividad multiunitaria (MUA) en FRM y los movimientos oculares rápidos, resultados muy similares a los obtenidos con inhibidores de síntesis protéica (Drucker-Colín y col., 1980).

Desafortunadamente, en el perfusado obtenido de FRM existe una gran cantidad de proteínas (al menos 8 bandas protéicas) y no se sabe cual o cuáles de estas bandas es(son) responsables de los efectos específicos sobre el sueño MOR.

A pesar de los grandes problemas metodológicos que existen en la separación y purificación de anticuerpos a bandas específicas, es sin duda claro que la continuación de esta investigación podrá dar evidencias más concretas sobre la participación de proteínas en la regulación del sueño MOR.

XVI.- METODOS PARA EL ESTUDIO IN-VIVO DE LIBERACION DE SUSTANCIAS NEUROACTIVAS EN EL SNC.

A pesar de que últimamente el desarrollo de la Voltametría in vivo -- una nueva técnica que permite obtener información sobre sustancias electroactivas que se encuentran en una área determinada del cerebro en animales anestesiados o no-anestesiados --, ha atraído el interés de un importante grupo de neurocientíficos, el uso de perfusiones in vivo por medio de cánulas push-pull, ha sido sin duda uno de los métodos que mas ha ayudado a estudiar diferentes eventos neuroquímicos que ocurren en áreas específicas del cerebro en animales en libre movimiento.

A.- CANULA PUSH-PULL

Esta cánula que permite perfusiones en áreas específicas del cerebro de casi cualquier animal de laboratorio en libre movimiento, fue introducido por Fox y Hilton en 1958. Sin embargo fue Gaddum, (1961) el que la adaptó para perfusiones localizadas del cerebro. Esta cánula ha sido usada por varios investigadores con dos objetivos principales 1) la evaluación in-vivo de diferentes sustancias (conocidas o no) que son

liberadas de las células nerviosas y 2) para la administración in-vivo de diferentes fármacos a regiones específicas del cerebro.

Así, un gran número de investigadores han evaluado la liberación espontánea de diferentes neurotransmisores: Acetilcolina (ACh) (Stadler y col, 1973); Norepinefrina (NE) (Chase and Kopin, 1968); Serotonina (5-HT) (Puizillout y col, 1979); Gaba, (Ondo y col, 1982). Otros han evaluado la liberación de neurotransmisores de regiones específicas del cerebro por medio de la administración de diferentes drogas (Bartholini y col, 1976). Además la cánula push-pull ha sido adaptada para otros múltiples usos, teniendo como objetivo principal conocer de manera más precisa el funcionamiento de un grupo de células en relación a cierta conducta o conocer con mayor profundidad los mecanismos que controlan la liberación de alguna sustancia endógena. Así por ejemplo McGinty y col, (1981) adaptaron a la cánula push-pull un sistema que permite a la vez que se efectúa la perfusión de un sitio específico del cerebro, conocer las modificaciones de la actividad unitaria de células próximas al sitio de perfusión. Otra importante adaptación que se ha hecho a la cánula push-pull la desarrollaron Poizillout y col, (1977), quienes la adaptaron especialmente para la obtención de perfusados en diferentes compartimentos según el estado de vigilancia en que se encuentre el animal en estudio.

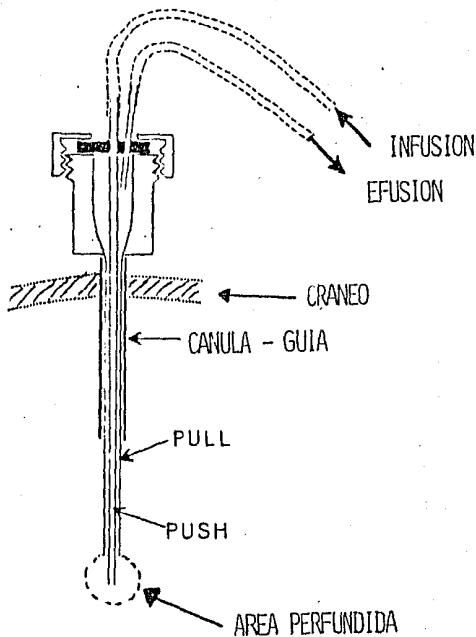
Una importante adaptación metodológica a la cánula push-pull que inicialmente se usó para el estudio de la liberación in-vivo de 3H-dopamina a partir de 3H-tirosina en el núcleo

caudado del gato, fue desarrollada por Nicoullon y col en 1977. La innovación de esta cánula fue la adopción de un sistema de recolección abierta (open pulling system). Esta modificación permitió fundamentalmente la reducción de la presión sobre el tejido y con ello la minimización del daño tisular alrededor de la cánula.

El funcionamiento de una perfusión usando una cánula push-pull requiere de una serie de consideraciones metodológicas que son de extremada importancia para la obtención de datos reales y fidedignos. Aspectos tales como duración de la perfusión, velocidad del flujo del líquido de perfusión, tipo de cánula y bomba usada, son sólo algunas de las consideraciones que es necesario tomar en cuenta antes de empezar una perfusión. Además se ha observado que tanto la tonicidad del líquido de perfusión (Yaksh y Yamamura, 1974) como la distancia entre la punta de la cánula pull y la punta de la cánula push (Szerb, 1967) son también factores importantes que afectan la obtención de buenos resultados.

Finalmente cabe señalar que cánulas en paralelo denominadas Chemitrodos por Delgado y Col, 1962 y cánulas de diálisis o dialiatrodos desarrollados por el grupo de Delgado (Delgado y col, 1972) y modificados por Kovacs y col, 1976; Ungerstedt y col, 1984), han sido sin duda modificaciones importantes de la cánula push-pull y que tienen también como objetivo el poder analizar la dinámica neuroquímica de regiones específicas del cerebro estudiando animales vertebrados en libre movimiento.

CANULA PUSH - PULL



CANULA PUSH - PULL: Aquí se muestra un diagrama de la cánula push - pull, que consiste en un sistema de dos tubos concéntricos de acero inoxidable (uno externo (pull) de 21 gauge y uno interno (push) de 27 gauge. Este sistema se introduce en el animal, que previamente ha sido implantado con la cánula-guía, la cual sirve de guía hacia el sitio de perfusión elegido y además brinda soporte y fijación para la cánula push-pull. Nótese que la cánula push protruye por sobre la punta de la cánula pull.

B .- FUNCIONAMIENTO DE LA CANULA PUSH-PULL

La situación de sistema de perfusión antes de comenzar una sesión experimental es la siguiente:

La jeringa que está conectada a la tubería de la pull (jeringa de recolección) está vacía. La jeringa que está conectada a la tubería de la push (jeringa de infusión) está llena de líquido de perfusión y todo el sistema muy bien purgado. En el momento en que se prende la bomba tanto la jeringa de la push empieza a infundir el líquido como la jeringa de la pull a extraer el mismo, ambos a la misma velocidad. Esto se traduce en que en la punta de la cánula sale un pequeño volumen del fluido de perfusión y éste es rápidamente absorbido por el sistema pull, con la ventaja, de que el líquido ya hizo contacto con el tejido circundante y por lo tanto permite recoger sustancias neuroactivas del líquido extracelular que se han liberado de las células nerviosas. De este modo lo que se está haciendo realmente es un "lavado" de una región muy específica del cerebro. Al cabo de 15 minutos (tiempo total para cada colección) se para la bomba, se desmonta la jeringa de la pull (jeringa de recolección), se mide el volumen colectado en ese período de tiempo (este es un control muy importante para constatar el funcionamiento del sistema ya que debe de recuperar en lo posible el 100% de volumen de que se está inyectando) para esa colección y se anota en la hoja protocolo junto con las observaciones importantes que ocurrieron en ese período. Luego se vacía el contenido en un tubo (1.5 ml) de microfuga,

se pone en hielo y la jeringa de colección ya vacía se vuelve a montar en la bomba de perfusión. Se revisa el contenido de la jeringa de infusión (push) y si hay volumen suficiente para la otra colección y está todo en orden, se procede a prender la bomba y comienza un nuevo período de colección.

C. - VENTAJAS DE LA CÁNULA PUSH-FULL

Por posibilitar su uso en animales en libre movimiento, la principal ventaja de la cánula push-pull, es permitir estudiar la correlación de diferentes eventos bioquímicos que ocurren en un microambiente celular específico, con diferentes estados conductuales. Sin embargo, el uso de esta cánula presenta otras ventajas, algunas las cuales aún no han sido bien explotadas.

- 1) El perfundir al mismo tiempo dos regiones diferentes del cerebro y estudiar por ejemplo como son los patrones de liberación de una sustancia 'X' en ambas regiones dependiendo por ejemplo del estado de vigilancia del animal.
- 2) Permite comparar el patrón de liberación in-vivo de sustancias endógenas y su correlación con una conducta específica en diferentes especies.
- 3) Permite comparar el patrón de liberación in-vivo de sustancias endógenas en animales de diferentes edades, y

así realizar un estudio ontogenético al respecto.

- 4) Permite también estudiar el efecto de la hora del día (componente circádico) y el efecto de diferentes ciclos de luz y oscuridad sobre los patrones de liberación endógena.
- 5) Permite perfusiones cruzadas de una animal a otro.
- 6) Posibilita el estudio profundo de un microambiente neuronal con la posibilidad de llevar a cabo manipulaciones farmacológicas y electrofisiológicas.
- 7) Con la adición de un termódo permite valorar los efectos de diferentes temperaturas (en el sitio de perfusión) sobre los patrones de liberación de sustancias endógenas.
- 8) Permite el estudio in-vivo de transporte axonal.

Estas ventajas son sólo algunas, evidentemente existen muchas otras, pero creo que con lo ya mencionado queda claro, el enorme potencial de su uso en las neurociencias.

D.- DESVENTAJAS DE LA CANULA PUSH PULL

Desgraciadamente esta técnica también presenta algunas desventajas que son importantes de mencionar.

- 1) La introducción de la cánula produce un daño celular que en algunos casos pueda ser importante, pero que en otros

no parece ser mayor que el producido por la introducción de un electrodo.

- 2) La duración de una perfusión no puede ser ilimitada y se ha observado que mientras más dura una perfusión mayor es el daño tisular en el sistema en estudio.
- 3) La posibilidad de obstrucción del flujo, que desafortunadamente a veces ocurre con más frecuencia de lo que uno quisiera. En nuestro sistema (que evidentemente no es el óptimo) alrededor de cuatro de cada diez perfusiones son descartadas por problemas de tapados y por tanto la obstrucción de flujo.
- 4) Es difícil evaluar la cinética de la desaparición de una sustancia introducida al sistema nervioso por medio de este método. Así mismo es difícil calcular la concentración de una sustancia "X" una vez infundida en el tejido y poder determinar con exactitud el área perfundida.
- 5) Es evidente que este sistema no permite estudiar eventos bioquímicos que ocurren muy rápido y por tanto los cambios físicos en la liberación de alguna sustancia son muy difíciles de percibir.

Existen probablemente otras desventajas pero con las que ya he mencionado se muestra que aún existe mucho por hacer para optimizar este sistema.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.

En base a los antecedentes anteriormente discutidos creo que he proporcionado bastantes evidencias experimentales, tanto en preparaciones in-vitro como in-vivo, que señalan que la liberación de proteínas de células nerviosas parece representar un fenómeno fisiológico normal pero cuyos aspectos funcionales son aún ampliamente desconocidos.

Así mismo, a través de los antecedentes ya proporcionados, observamos que el líquido extracelular, que es el sustrato intermediario de una serie de eventos neuroquímicos involucrados en la transmisión nerviosa, parece ser también el "medio de transporte" para proteínas liberables de células nerviosas. Junto con esto, mencionamos que investigaciones realizadas por Brucker-Colin y colaboradores, mostraron evidencias que señalan que los niveles proteicos del LEC ya sea de la FRM o del Hipocampo del gato, no se mantienen constantes a través del ciclo sueño-vigilia. Por el contrario estos autores reportaron que en concomitancia con los periodos de movimientos oculares rápidos (MOR), existe un aumento específico de proteínas totales en el líquido extracelular de las dos áreas anatómicas ya mencionadas. Estas evidencias sugieren indirectamente, una relación aún no descifrada entre liberación de proteínas cerebrales y la aparición del sueño MOR. Ya que otros estudios han sugerido que durante los periodos de sueño MOR habría una mayor síntesis proteica cerebral (Oswald, 1966; Adam, 1980), estos aumentos de los niveles de proteínas en el LEC, en paralelo

con la fase de sueño MOR, podría representar un buen correlato de este fenómeno. Sin embargo, la demostración experimental aún no se ha realizado. Aún mas, debido a que el marco proteico del líquido extracelular podría representar una mezcla de proteínas de diferentes orígenes (plasma, LCR y células nerviosas) se debiera definir en primera instancia el origen de estas proteínas. En otras palabras, se debiera desarrollar una estrategia experimental que permita definir si al menos parte de las proteínas encontradas en el LEC proviene de un proceso fisiológico normal de liberación proteica de células nerviosas.

El objetivo principal de este estudio fue desarrollar una estrategia experimental que permita en un animal en libre movimiento, definir con certeza si parte de las proteína que se encuentran en el líquido extracelular, se originan de células nerviosas. La importancia del desarrollo de esta estrategia en un animal en libre movimiento radica fundamentalmente en la necesidad de evaluar este fenómeno con los patrones del ciclo sueño-vigilia.

Si esta estrategia resulta exitosa y por ende se logra demostrar el origen tisular de al menos parte de las proteínas encontradas en el líquido extracelular, la realización de ciertas manipulaciones bioquímicas ayudaran a decifrar algunas de las diferencias y/o similitudes con la liberación neuronal de neurotransmisores clásicos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El uso de la cánula push-pull que permite perfusiones localizadas del tejido nervioso en animales en libre movimiento, representa una técnica adecuada para los objetivos ya mencionados. La posibilidad de obtener un muestreo continuo del LEC de una región específica del cerebro, nos permitirá evaluar la existencia de la liberación de proteínas de células nerviosas.

Ya que nuestro objetivo es poder detectar proteínas que se liberan de células nerviosas a diferencia de proteínas que también se encuentran en el LEC pero que tienen un origen distinto, debieramos desarrollar una estrategia que permita marcar proteína de origen tisular de manera específica.

La aplicación tópica de un precursor de proteínas marcado radioactivamente (GLUC-14C o NET-35S) sobre un grupo de células determinado, posibilitará marcar radioactivamente proteínas de este sitio anatómico. Si existe un grupo de proteínas que han incorporado el precursor radioactivo y que se liberan de estas células al espacio extracelular, la obtención de un muestreo continuo del LEC debiera permitir la detección de dichas proteínas. Por lo tanto, si a través del análisis de los perfusados se detectan proteínas marcadas radioactivamente, quedará establecido el origen tisular de estas proteínas.

MATERIALES y METODOS

I.- SISTEMA DE PERFUSION

El sistema de perfusión usado en nuestros experimentos consistió en una cánula-guía (18 gauge de acero inoxidable) la cual funciona como una guía esterotáxica para la cánula push-pull y que es implantada en el animal una semana previa al experimento. El extremo apical queda a unos 2-3 milímetros por arriba del sitio de perfusión y la cánulaguía se mantiene con un mandril hasta el día de la perfusión el cual es reemplazado por la cánula push-pull. La cánula push-pull concéntrica, consiste en un tubo externo (pull) de 21 gauge y un tubo interno (push) de 27 gauge, ambos de acero inoxidable. La cánula push tiene en su punta un bisel como el de una aguja de jeringa y protruye 0.5-1.0 mm de la punta de la cánula pull. Ambas partes de la cánula (push-pull) fueron conectadas a través de tuberías de polietileno a las jeringas (jeringas de plástico desechables de 1 cc) de infusión y extracción montadas en una bomba Harvard (modelo 940) de funcionamiento recíproco. La velocidad de flujo se mantuvo constante durante toda la perfusión tanto en la push como en la pull y estas fueron de 10, 17.7 ó 25 ul/min, dependiendo del experimento. Durante las perfusiones realizadas con gatos se colectaron fracciones cada 30 minutos a diferencia de cuando se usaron ratas en que la colección se hizo cada 15 minutos. El líquido de perfusión para ambos casos fue un

Ringer bicarbonato-Krebs que contiene 127 mM de NaCl, 3.73 mM de KCl, 1.8% de CaCl₂ 1.18 mM de K₂HPO₄, 1.18 mM de MgSO₄, 20 mM de NaHCO₃ y 2 grs /lt de D-glucosa.

Para evitar artefactos causados por la manipulación de las jeringas en la bomba (Yaksh y Yamamura 1974) se usaron llaves de tres vías que permiten abrir y cerrar el sistema a conveniencia. El posible artefacto producido por la necesidad de parar la bomba para la colección de cada fracción afecta de igual manera a todas las colecciones por tanto no debiera oscurecer los resultados experimentales obtenidos.

Durante el tiempo de colección la jeringa donde se colectaron los perfusados, fue mantenida con una bolsita de plástico con hielo para evitar la destrucción de sustancias neuroactivas lábiles a la temperatura.

II.- IMPLANTACION DE ANIMALES

La implantación de cánulas guía tanto en gatos como en ratas se hizo en animales anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg/kg) sobre el aparato estereotáxico. Las coordenadas de núcleo caudado y FRM usados en el gato (de unos 3 kgs.) fueron A.- 16.0 L.- -5.0 V.- + 5.0 (con corrección a 45 para evitar pasar a través del espacio ventricula) y A.- 0.0 L.- 2.0 V.- -2, respectivamente según Sneider y Niemer (1970). Las coordenadas de núcleo caudado para la rata (wistar) de 300-420 grs fueron: A.- +2 L.- -0.75 V.- -2.0, según Pellegrino y col, (1979).

La cánula guía tanto para gatos y ratas fue implantada de tal manera que quedara 2 a 3 mm por arriba del sitio de perfusión. Junto con la cánula guía se pusieron tres tornillos en el hueso para permitir una mayor fijación de acrílico. Ya que la parte externa de la cánula guía quedaba un poco expuesta a recibir golpes se le protegió con un trozo de jeringa desechable.

El uso de Atropina (2 mg/ml) para evitar secreciones en el animal y el de Xilocaina con Epinefrina (10 mg/ml) para evitar sangrados importantes, se llevó a cabo según las necesidades.

En el grupo de ratas las cuales también se usaron para registro de patrones de sueño junto con la perfusión, se implantaron electrodos para medir EMG (Electro-miograma), EEG (Electro-encefalograma) y actividad theta del hipocampo dorsal. Para el registro de EMG se usaron dos electrodos monopolares introducidos en los músculos de la nuca. Para efectos de medir el EEG se colocaron tres tornillos localizados a 2 mm a cada lado de la línea media y un tercero 2 mm. anterior y lateral a bregma. Para la obtención del ritmo theta hipocampal se usó un electrodo bipolar que fué implantado en el hipocampo dorsal (A.- 4.8 (bregma) L.-3.0 V.-3.0) según Pellegrino y col, 1979. El registro de los patrones de sueño se realizó en paralelo con la perfusión (7 horas). Se usó una velocidad de papel de 10 mm/seg. en un poligrafo Grass Modelo 78D. El análisis de las etapas de sueño se llevó a cabo visualmente diferenciando sueño REM, sueño NON-REM, vigilia.

III.- ADMINISTRACION DEL PRECURSOR RADIOACTIVO

Las características de los precursores radioactivos usados en nuestros experimentos fueron las siguientes:

1) D- (u-14 C) glucosa

Actividad específica	2.8 mCi / m mol
Peso molecular	180
Concentración de radioactividad	1 mCi / ml
Pureza radioquímica	99 %

2) L- (35S) MET

Actividad específica	1180 Ci/m mol.
Peso molecular	149.2
Concentración de radioactividad	1 mCi/.1ml
Pureza radioquímica	97.5%

La D-(U-14C)-GLUCOSA se usó fundamentalmente en los experimentos en los cuales el gato fue nuestro animal de experimentación. La decisión de usar D-(U-14C)-GLUCOSA como precursor para marcar proteínas cerebrales radica fundamentalmente en:

- 1) Su rápida incorporación a células nerviosas.
- 2) Porque posibilita el marcar diferentes aminoácidos que posteriormente se pueden incorporar a proteínas.

- 3) Por su menor costo en comparación con aminoácidos radioactivos.

Sin embargo posteriormente hubo necesidad de cambiar el precursor y también el animal de experimentación. (ver sección Desarrollo Experimental para mas detalles) y así L-355-NET se usó fundamentalmente en experimentos con ratas.

IV.- FORMAS DE INCORPORAR EL PRECURSOR RADIOACTIVO

Existen básicamente dos formas de incorporar el precursor radioactivo al sitio anatómico específico en estudio.

A.- PERFUSION CONTINUA DEL PRECURSOR.

Incorporar el precursor de manera continua al sistema tiene la fundamental ventaja de poder saturar las pozas endógenas (ya sea de aminoácidos o glucosa) y así obtener una actividad específica constante. De esta manera se podría visualizar con mayor claridad algún cambio espontáneo fisiológico y también cambios producidos por alguna manipulación depolarizante. Sin embargo esta forma de incorporar el precursor al sistema, presenta unas desventajas importantes que obligarian a realizar una serie de experimentos para determinar:

- 1) Cantidad óptima del precursor: Es decir poder definir la

cantidad óptima a usar , de tal manera que se pueda aprovechar al máximo la capacidad que tienen las células de capturar el precursor y por tanto evitar un desperdicio del marcador radioactivo fundamentalmente por lo caro del material.

2) Fijar la velocidad de flujo de la perfusión: Es necesario poder fijar la velocidad de flujo óptima de perfusión de tal manera que se le posibilite a las células la captura del precursor y así evitar la "captura de regreso" o recaptura del marcador por sistema de extracción (pull) sin, que las células hayan tenido la oportunidad de incorporarlo.

3) Tiempo mínimo de perfusión: Es decir poder fijar el tiempo de perfusión de tal manera que nos permita poder obtener las proteínas liberables que han incorporado el marcador radioactivo.

B.- PULSO UNICO DEL PRECURSOR.

Esta forma de incorporar el precursor presenta una clara ventaja y esta es el evitar el desperdicio del material radioactivo. Teóricamente, toda o prácticamente toda la marca que se administra al tejido, debiera entrar a éste. Sin embargo, fuera del problema de la cantidad de marca óptima a usar, del tiempo mínimo de perfusión, se agregan dos nuevos problemas: 1) El determinar el tiempo óptimo de espera entre la administración del precursor y el inicio de la perfusión. 2) La dificultad en el control de la saturación de las

pozas de aminoácidos y/o glucosa.

Como se puede apreciar ambas formas de administrar el precursor radioactivo, presentan ventajas y desventajas. En la sección de Desarrollo Experimental se podrá, seguir la evaluación de esta disyuntiva.

La administración del precursor radioactivo en la forma de pulso único se llevó a cabo con la misma cánula push-pull usada en las perfusiones. En la mayoría de los experimentos (con excepción de los experimentos realizados en gatos) la inyección se realizó en el Nucleo Caudado de la rata, en un volumen de 3 μ l durante 15 min.

Existen dos buenas razones que explican el porqué se escogió el Nucleo Caudado de la rata, para la realización de estos experimentos:

- 1) Es una estructura anatómica fácilmente identificable y muy accesible para ser extraída posterior a la finalización de la perfusión, lo que permite un análisis bioquímico del tejido perfundido. Este análisis representa una parte fundamental del experimento ya que permite un entendimiento mas cabal de los resultados obtenidos.
- 2) El estriado de la rata es conocido por contener una de las mas altas concentraciones de encefalinas en el SNC, (Hokfelt y col, 1977; Young y col, 1977). Así mismo, recientes reportes han mostrado la liberación de encefalinas de este sitio anatómico en preparaciones in-vitro (Bayón y col, 1978) e in-vivo (Bayón y col, 1981). Además sabemos que

las encefalinas estas inciertas en una molécula proteica mas larga (pro-encefalina A). En otras palabras ya sabemos que de este sitio anatómico se libera un péptido que contiene en su molécula Metionina (MET-encefalina) y es muy probable que este péptido no se libere sólo, sino que junto con parte de su molécula proteica precursora.

V.- DESARROLLO DE UN EXPERIMENTO TIPO.

Un experimento típico consiste en: Implantar al animal con su cánula guía. Al cabo de una semana posterior a la implantación se realiza el experimento que consiste en la administración del precursor radioactivo (Met-³⁵S) sobre el sitio anatómico a ser perfundido. Posterior a la inyección del precursor radioactivo se espera 1 hora 45 minutos para la introducción de la cánula y 2 horas para comenzar la perfusión. Una vez iniciada la perfusión se obtienen colecciones cada 15 minutos, a cada colección se le mide su volumen y se miden por duplicado alícuotas de 10 μ l para evaluar Cuentas Totales (C.Tot). Posteriormente se guarda cada muestra en el congelador a -4 C hasta la realización de los análisis posteriores. La duración de las perfusiones fué por lo general de 8 horas, al término de la cual se procede a sacrificar al animal con sobredosis de anestesia. Se extrae el núcleo caudado, se homogeniza con agua destilada en un volumen de 1 ml; se centrifuga a 4,000 rpm por 30 minutos y el sobrenadante se precipita con TCA al 15% en un volumen de

1.0 ml y se congela hasta el análisis de Mans y Novelli (proteínas marcadas) y/o el de Lowry (proteínas totales).

VI.- PROCESAMIENTO DE LAS FRACCIONES COLECTADAS

Una vez obtenidas las fracciones de perfusado y ya medido sus volúmenes se siguen los siguientes análisis:

- 1) Quantificación de cuentas totales. Se toman por duplicado alícuotas de 10 ul de cada fracción para saber la cantidad de cuentas liberadas en un periodo de colección. Posteriormente se congelan a -4 C hasta el siguiente análisis.
- 2) Quantificación de proteínas totales. Este análisis se lleva a cabo en duplicado de 80 ul cada uno por la técnica Lowry y col, 1951. Para estas mediciones se usó a la albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar. Para la curva estándar se tomaron nueve diferentes concentraciones de esta proteína. Se procesaron como máximo 30 muestras por ensayo.
- 3) Quantificación de proteínas marcadas. Este análisis se llevó a cabo mediante la técnica de Mans y Novelly (Mans y Novelli (1961), usando por lo general triplicados (100 ul x 3) ó en su efecto duplicados de cada fracción. En cada ensayo se procesaron fracciones de 2 ó 3 perfusiones (70 - 100 discos).

El volúmen restante se dejó eventualmente para medir la enzima lactico deshidrogenasa (LDH) o si alcanzaba, para repetir algún análisis en caso de que fuera necesario.

VII.- TÉCNICA DE MANS Y NOVELLI

Esta técnica fué desarrollada por Mans y Novelli en 1961 y permite la medición de la incorporación de aminoácidos radioactivamente marcados en proteínas. Este método se usó para medir las proteínas marcadas tanto de las fracciones colectadas durante la perfusión como para las del tejido donde se realizaron las perfusiones. En breve la técnica consiste en:

Vertir de manera homogénea una alícuota de perfusado (100 μ l por triplicado sobre unos discos de papel Whatman No. 3 (2.3 cms. de diámetro) los cuales estaban ya específicamente marcados y montados en alfileres entomológicos sobre una placa de poliuretano. Las alícuotas (100 μ l * 3) de cada fracción de perfusado, contenía 50 μ g de BSA que servía como acarriador de proteínas. La preparación de las alícuotas de tejido (100 μ l * 3) consistía en: 1) Centrifugar el tejido en 1.0 ml de agua destilada por 30 min a 4000 rpm. 2) El sobrenadante se precipitaba con ácido tricloroacético (TCA) al 15 % en un volúmen de 1.0 ml y se congelaba hasta el momento del análisis. 3) Al momento del análisis el precipitado se resuspendía con NaOH .1 N y de aquí se llevaban las alícuotas directamente a los discos. Una

vez terminada la colocación de alícuotas sobre los discos se procedía a secarlos con corriente o pistola de aire tibio. Posteriormente los discos secos y sus respectivos controles fueron inmersos en una solución de (TCA) (10%) con 1 mM de L-MET fría en baño de hielo. El volumen de esta solución fue determinado por el número de discos a ser procesado. Aproximadamente se pusieron 3 ml. por cada disco. El ácido (TCA), fija cuantitativamente la proteína en la matriz de fibras de celulosa de papel filtro y mantiene en solución la MET libre. La adición de MET-fría diluye la actividad específica de la MET-35S (caliente) no incorporada a proteína y produce una considerable disminución de los valores controles a tiempo cero. Este lavado se deja por dos horas como mínimo en baño de hielo y se agita esporádicamente. Al finalizar las dos horas se le cambia la solución (igual pero nueva) y se deja 15 minutos a temperatura ambiente. Al terminar este periodo se cambia otra vez la solución pero en esta oportunidad se incubaba a 86 C por 30 minutos para hidrolizar el ARN y aminoácidos con ARN. Los discos fueron otra vez resuspendidos en la misma solución por otros 15 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar estos cuatro lavados se procedía a incubar los discos a 37 C, por no menos de 30 minutos en una mezcla de eter-etanol (1:1) para poder quitar el TCA y los lípidos. Un segundo lavado en eter-etanol pero a temperatura ambiente se llevó a cabo para quitar la radioactividad restante que pudiera estar asociada a lípidos. Posteriormente se efectuaron dos lavados esta vez

solo con éter por 15 minutos cada uno a temperatura ambiente para quitar el alcohol y agua y todo solvente polar que haya quedado en el disco. Una vez terminados estos lavados se volvieron a montar los discos en los alfileres y una vez secos, se metieron a los viales de centelleo mas 8 ml. de tritosol (Fricke,1975) y se llevaron al contador de centelleo.

VIII.- TÉCNICA DE LOWRY

Esta técnica fue desarrollada por Lowry y col, en 1961 y permite la medición de proteínas en distintas muestras biológicas.

La técnica consiste en tratar la muestra primero con una solución de cobre alcalino, así se mezcla la muestra con: a) 2% de Na_2CO_3 , en .1 N de NaOH con b) que es .5% de CuSO_4 en 1% de tartrato de Na/K en proporción de 5 a 1 respectivamente. Posteriormente se hace reaccionar la muestra con una mezcla de fenol-folin (1:1).

Este tratamiento hace que el contenido proteico se coloree y por tanto pueda ser usado el espectrofotómetro para su lectura. El método tiene una serie de ventajas: 1) es 100 veces más sensible que la reacción de biuret y también mas sensible que la reacción de ninhidrina (Kimkel y Ward,1950), 2) es 10 a 20 veces mas sensible que la medición con UV a 280 μ y también es mas específica y menos propensa a disturbios por turbidez.

Existen sin embargo tres importantes desventajas: 1) la cantidad de color varía con diferentes proteínas, 2) el color no es estrictamente proporcional a la concentración y 3) lee como proteínas a una serie de compuestos no proteicos. (para mas detalles ver tabla # 1 en Densadoun y Weinstein, 1976.

Tomando en cuenta las ventajas y desventajas se aconseja el uso de este método para 1) medición de proteínas en mezcla de tejido, especialmente cuando los valores absolutos no son necesarios, 2) medición de cantidades absolutas muy pequeñas o de muestras de proteínas muy diluidas (ejemplo: el fluido espinal) o mezclas de proteínas de sustancias coloreadas y con sustancias que contienen nitrógeno, 3) para el análisis de un largo número de muestras proteicas, tales como precipitados de antígenos-anticuerpos.

Ya que los volúmenes de cada fracción de perfusado eran reducidos (aprox 300 ul c/u) y de cada fracción se requerían una serie de análisis, esta técnica fue modificada para muestras de 80 ul y además se usaron volúmenes de reacción reducidos para mejorar la sensibilidad del método.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

1.- Controles de la técnica de Mans y Novelli

Debido a que solo un apropiado uso de la técnica de Mans y Novelli es lo que dará confianza a nuestros resultados, en primera instancia hubo la necesidad de llevar a cabo una serie de experimentos controles con el objeto de valorar y por tanto conocer con más profundidad las posibilidades y limitaciones de esta técnica.

La Figura # 1, nos muestra la eficiencia de lavado de esta técnica para marca radioactiva (^{35}S -MET) que no ha sido incorporada a proteínas. Discos de papel filtro que contenían tres diferentes cantidades de ^{35}S -MET: 1082500, 137750 y 44050 cpm's respectivamente (en triplicados), se procesaron según los lavados de la técnica de Mans y Novelli. Posterior a este procedimiento, la cantidad de marca que quedó en los discos fué: 657, 205 y 25 cpm's respectivamente. Estos valores equivalen a un 0.06, 0.14 y 0.06 % respectivamente del total que había en los discos previo al lavado. Como se puede apreciar el lavado es bastante eficiente. En otras palabras, la cantidad de marca radioactiva no incorporada a proteínas que puede quedar en los discos posterior al lavado es mínima y por lo tanto se puede inferir con bastante certeza, que si detectamos marca radioactiva en los filtros posterior al lavado de Mans y Novelli, ésta se encuentra en su mayoría asociada a proteínas. Además, teniendo en cuenta que nunca se

EFICIENCIA DE LA TÉCNICA DE LAVADOS DE DISCOS
MANS Y NOVELLI

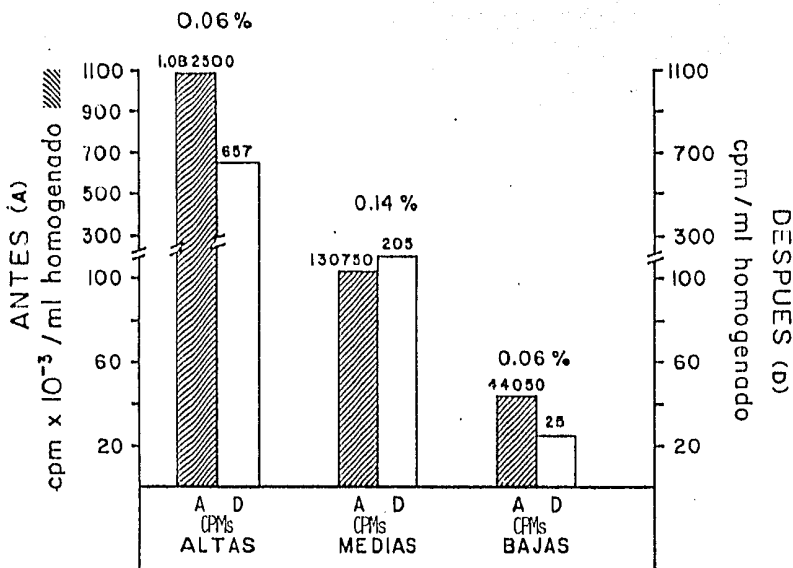


FIGURA # 1 : Eficiencia de la técnica de lavado de discos MANS y NOVELLI.

La eficiencia de esta técnica se determinó para discos cargados con cpm's de MET-35S ALTAS (1.082.500), MEDIAS (130.750) y BAJAS (44.050). Las barras achuradas denotan el total de cpm's en discos antes (A) del lavado y las barras vacías denotan el total de cpm's en los discos después (D) del lavado. Las diferencias para cada caso también se expresan en porcentajes. Los valores son el promedio de triplicados en cada caso.

pusieron mas de 20.000 cpm's por disco al lavado, (incluso suponiendo que todo sea marca no incorporada a proteínas) los resultados mostrados en la Figura # 1 aseguran practicamente que no se detectará marca radioactiva alguna que no corresponda a la asociada a proteínas. Consecuentemente estos datos dan credibilidad a nuestros resultados de incorporación del precursor radioactivo a proteínas.

Con el objeto de obtener una mayor diversidad de controles para ser usados por esta técnica, se realizaron otra serie de experimentos que incluyeron : 1) Congelar y descongelar el tejido y luego inyectar la marca radioactiva, posteriormente homogenizar y tomar de aquí alícuotas para el análisis de Mans y Novelli. 2) También se hirvió un homogenado de tejido previo a la introducción de la marca y luego se llevó al lavado de Mans y Novelli. 3) Otro control fue la introducción al tejido de la marca radioactiva disuelta en TCA (10 %) y posteriormente se analizó la incorporación al tejido usando la técnica de lavado ya mencionada.

Todos estos últimos controles mostraron que en circunstancias donde no puede ocurrir síntesis proteica y por ende no incorporación de ^{35}S -MET a proteínas, el proceso de lavado de ésta técnica era de una eficiencia similar a lo que resultaba, cuando se procesaban filtros que contenían marca radioactiva no incorporada.(fig # 1). Debo mencionar también que de manera sistemática se usaron como controles blancos para esta técnica, la introducción de discos sin nada de radioactividad al matríz de lavados para poder determinar la

"contaminación" entre discos y así obtener el nivel " 0 " o basal de radioactividad.

Teniendo ya un conocimiento más cabal de la técnica de Mans y Novelli, nos sentimos en mejor posición de iniciar los experimentos para el estudio de la liberación de proteínas de células nerviosas.

II.- Experimentos preliminares con gatos.

Los primeros experimentos que se llevaron a cabo con el propósito de estudiar el fenómeno de liberación de proteínas en el SNC, fueron realizados usando al gato como animal experimental. La razón es sencilla, los antecedentes que existían en cuanto a la liberación de proteínas, en animales en libre movimiento provenían de estudios con gatos (Drucker-Colín, 1975). Además y como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos en los primeros experimentos usamos D-(U-14C)-GLUCOSA como precursor radioactivo.

Los primeros experimentos se realizaron usando la forma de incorporación continua del precursor al tejido a través del líquido de perfusión. Usando en principio flujos de 25 ul/min observamos que no sólo prácticamente todo lo que metíamos al sistema lo estábamos recogiendo de regreso, sino que además lo poco que se quedaba en el tejido, era aparentemente insuficiente para permitir marcar las proteínas liberables.

Posteriormente se usó una velocidad de flujo de 10

ul/min (velocidad de flujo que es bastante lenta y que desafortunadamente posibilita mayores problemas en el funcionamiento del sistema de perfusión) para permitir al tejido una mayor captura de nuestro precursor. Además, se puso una cantidad bastante alta de (GLUC-14C) en el medio de perfusión. Los resultados de estos experimentos fueron bastante "prometedores". Como se puede observar en la Figura # 2, los niveles de la gráfica de Mans y Novelli (la incorporación de marca a proteína) no son para nada bajos y esto a pesar de que como lo muestra la gráfica de cuentas totales, más del 98% de la marca radioactiva introducida por la cánula push, se obtenía de regreso a través de la cánula pull. En otras palabras, la captura de la GLUC-14C por el tejido en estas condiciones fue mejor y posibilitó cargar el área perfundida con nuestro precursor y empezar a detectar incorporación de marca a proteínas liberables nada despreciables. Además, resulta importante la correlación de picos que existe entre la gráfica de proteínas marcadas (Mans y Novelli) y la gráfica de proteínas totales (Lowry). Este hecho pone de manifiesto que cuando se encuentra una cantidad apreciable de proteínas totales en el perfusado, parte de ésta corresponde a proteínas recién sintetizadas y liberadas de las células nerviosas. A pesar de que estos resultados eran "prometedores", la necesidad de modificar nuestra forma de administrar el precursor era obvia, ya que el alto costo de cada experimento, no nos permitía seguir adelante en nuestra investigación.

PERFUSION EN EL NUCLEO CAUDADO DE UN GATO QUE RECIBIO
EL PRECURSOR (D-GLUC-¹⁴C) DE FORMA CONTINUA.

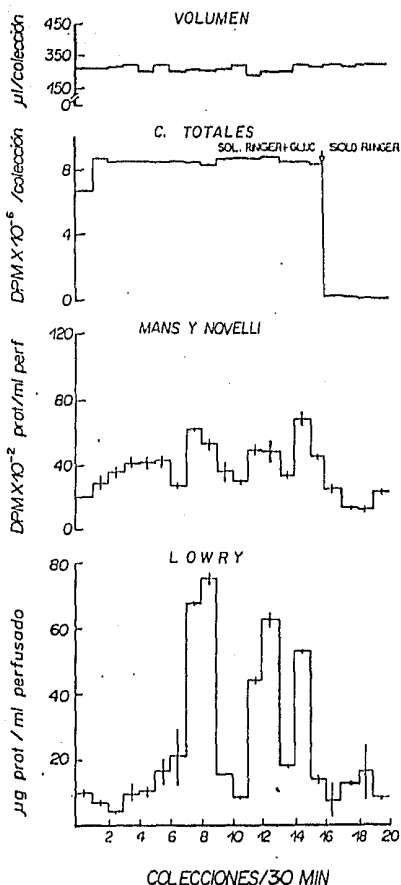


FIGURA # 2: Muestra los perfiles de volúmenes ($\mu\text{l}/\text{colección}$) recolectados en cada colección, las cuentas en proteínas (Mans y Novelli) ($\text{cpm} \times 10^{-2}/\text{ml perfusado}$) y los valores de proteínas totales (Lowry) ($\mu\text{g proteína}/\text{ml perfusado}$) para una perfusión de 10 horas en el núcleo caudado de un gato. En esta oportunidad la marca radioactiva (D-GLUC-¹⁴C) se incorporó continuamente al sitio de perfusión. Se obtuvieron colecciones cada 30 minutos. La velocidad de flujo fue de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ y a partir de la colección #17, la perfusión continuó sin el precursor radioactivo. Los valores corresponden al promedio de triplicados y D.S.M.

De esta manera decidimos modificar la forma de administración de nuestro precursor. Esta vez usamos la introducción de un pulso único que contenía a nuestro precursor radioactivo. Desafortunadamente no obtuvimos buenos resultados. En otras palabras, no logramos obtener niveles detectables (proteínas marcadas) medidas por la técnica de Mans y Novelli. Sin embargo, es probable que la cantidad usada de GLUC-14C haya sido insuficiente o que sencillamente por tener tantas vías metabólicas alternativas, (la incorporación del 14C de la glucosa a proteína ocurre principalmente vía ácido glutámico y ácido aspártico) la cantidad de glucosa necesaria para marcar nuestras proteínas hubiera tenido que ser muy grande y por lo tanto mayor de lo que su costo lo permitía.

Debido a estos problemas, buscamos otro precursor radioactivo de proteínas y encontramos que la MET-35S era una buena alternativa, ya que se podía conseguir con una alta actividad específica y el azufre, que es la molécula con la marca radioactiva, tiene un patrón de distribución mas limitado. Es decir, presenta menos vías metabólicas alternativas que glucosa a la incorporación en la maquinaria de síntesis proteica. Además, otros autores también la han usado con buenos resultados para medir síntesis de proteínas in-vitro e in vivo (Clouet y Richter, 1959). Ya con estas modificaciones realizadas se efectuaron otra serie de experimentos en gatos y con administración de pulsos únicos.

La Figura # 3 muestra, en un experimento ejemplo (gato #

86) que la cantidad de marca incorporada a proteínas es todavía muy baja. En esta oportunidad esperamos 30 min posterior a la introducción de la marca radioactiva para el inicio de la perfusión. Para tratar de mejorar estos bajos niveles de incorporación decidimos esperar 4 horas posterior a la inyección de la marca antes de comenzar la perfusión y así dar más tiempo al tejido para que incorpore el precursor radioactivo.

Otra vez el resultado fue negativo, la Figura # 4 muestra que los valores obtenidos por la técnica de Mans y Novelli para el gato # 98 son todavía muy bajos. Buscando una causa que explicase estos bajos niveles encontrados, nos percatamos que el total de marca recuperado (que incluye el total de marca radioactiva obtenida a través de la perfusión más la radioactividad encontrada en el tejido donde fue hecha la perfusión) correspondía en estos casos a menos del 20% del total teórico inyectado. A pesar de que entendemos que el porcentaje de recuperación no puede ser nunca de un 100%, los valores obtenidos en este caso denotaban un obvio problema metodológico en la inyección de nuestro precursor. Además, la existencia de un problema de difusión de la marca radioactiva por alguna vía humoral e incluso un posible factor de apagamiento (quenching) de conteo de radioactividad por el homogenizado del tejido perfundido, eran también alternativas factibles.

PERFUSION EN EL NUCLEO CAUDADO DE UN GATO QUE RECIBIO
 UN PULSO UNICO DEL PRECURSOR (MET - ³⁵S) 30 MIN
 ANTES DEL INICIO DE LA PERFUSION.

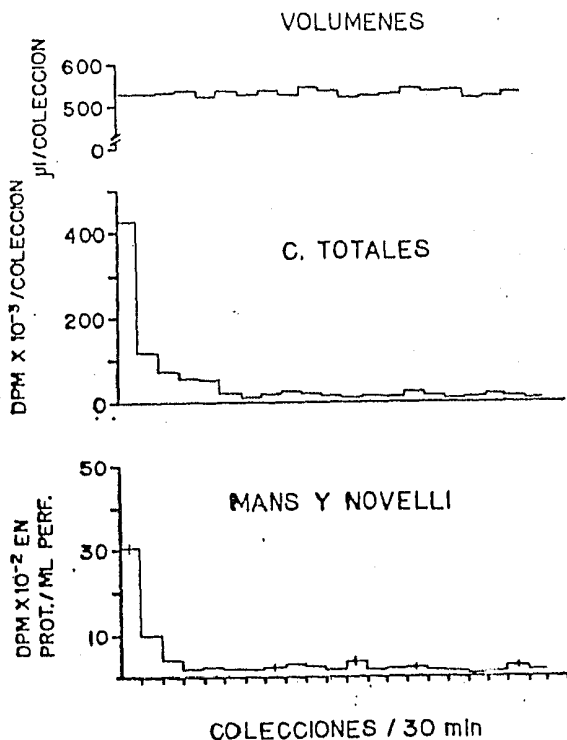


Figura # 3: Perfiles de volúmenes (ul/colección), de cuentas totales (DPM $\times 10^{-3}$ /colección) y de proteínas marcadas (Mans y Novelli) (DPM $\times 10^{-2}$ /ml perfusado). En esta oportunidad se administró un pulso único de MET-³⁵S (36,144,577 DPM) en el núcleo caudado derecho de un gato. La perfusión comenzó 30 minutos posterior a la administración del pulso. La perfusión duró 10 horas y se obtuvieron colecciones cada 30 minutos. La velocidad de flujo fue de 17.7 ul/min. Los valores corresponden a promedios de duplicados (C.Totales) y triplicados + D.S.M. (Mans y Novelli).

PERFUSION EN EL NUCLEO CAUDADO DE UN GATO QUE RECIBIO
 UN PULSO UNICO DEL PRECURSOR (MET - ^{35}S) 4 HORAS
 AVANTES DEL INICIO DE LA PERFUSION.

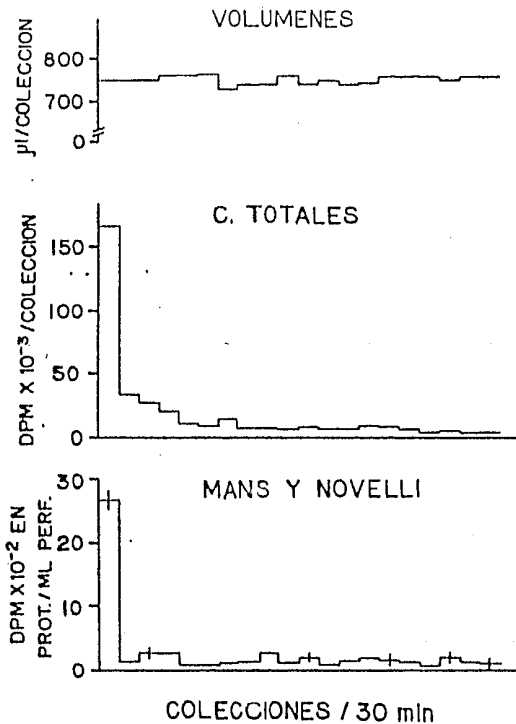


Figura # 4: Perfiles de volúmenes (ul/colección), cuentas totales (DPM $\times 10^{-3}$ /colección) y proteínas marcadas (Mans y Novelli) (DPM $\times 10^{-2}$ /ml perfusado). En esta oportunidad se dió un pulso único de MET- ^{35}S (25,834,451 DPM) en el nucleo caudado derecho de un gato. La perfusión empezó 4 horas posterior a la administración del marcador radioactivo y tuvo una duración de 10 horas. Se obtuvieron colecciones cada 30 minutos y la velocidad de flujo fue de 25 ul/min. Los valores corresponden a duplicados (C. Totales) y triplicados + D.S.M. (Mans y Novelli)

Para determinar el origen de este problema, se diseñaron experimentos que requerían el uso muchos animales de experimentación. Consecuentemente quedó claro que el gato no era el animal de experimentación ideal para tales propósitos. De esta manera decidimos cambiar nuestro animal de experimentación del gato a la rata.

III.- Experimentos con ratas

Teniendo ya el antecedente de la poca recuperación de la marca en experimentos con gatos, lo primero que quisimos averiguar ya en la rata fue hasta qué punto era posible confinar la inyección de la marca al sitio elegido, es decir quisimos averiguar el posible factor de difusión de la marca del sitio de inyección y como el factor tiempo podría influir en este proceso. La Figura # 5 muestra el " efecto de difusión" de la marca MET-35S a otras regiones del cerebro de la rata. Como se puede apreciar cuando la inyección de la marca se efectúa en la región del cuadrante A del cerebro de la rata, ésta se confina prácticamente en su totalidad a esta región, existiendo sólo una pequeña difusión a la región contigua del cuadrante C.

Este experimento muestra también que por lo menos hasta los 225 min posteriores a la inyección de la marca radioactiva no existe difusión significativa a otras regiones

DIFUSION DE LA MARCA RADIOACTIVA
A OTRAS REGIONES DEL CEREBRO.
(IN-VIVO)

SE INYECTARON 132.887 CPM DE MET-35S EN
UN VOLUMEN DE 3 μ L EN 15 MIN EN N. CAUDADO

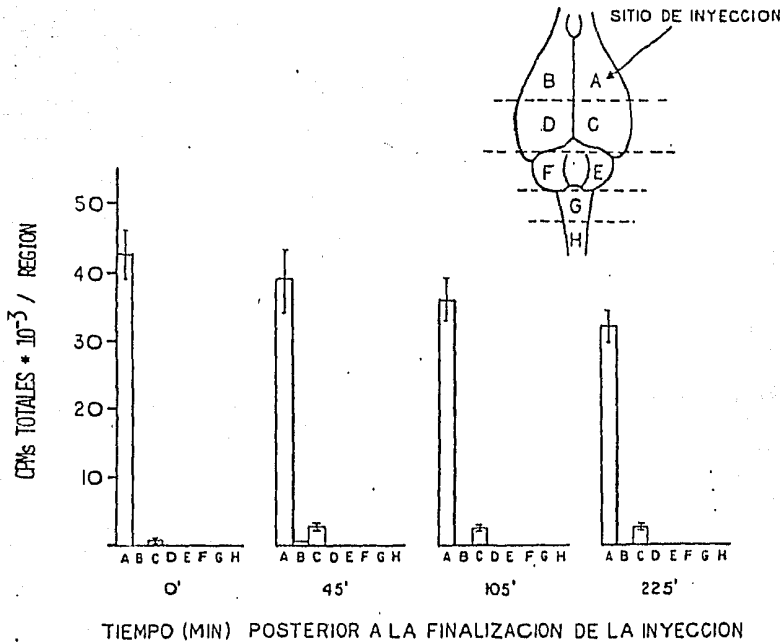


Figura # 5 : Difusión de la marca radioactiva (MET-35S) a regiones distintas del sitio de inyección y como el factor tiempo afecta este proceso. La inyección se realizó sobre el aparato estereotáxico en animales anestesiados. Los valores corresponden a triplicados + D.S.M. para cada caso.

del cerebro, es decir tampoco el tiempo es en este caso un factor que favorece la difusión a regiones distantes del cuadrante A. Sin embargo, como también se aprecia en la gráfica, la recuperación de radioactividad, al finalizar el período de inyección de 15 minutos, es sólo de un 42,5 % . Ya que estos experimentos fueron hechos in-vivo, (la inyección se realizó sobre el aparato estereotáxico en animales previamente anestesiados), no se puede descartar la posible difusión por vía sanguínea aunque sí (y por la manera de como se realizaron los cortes del tejido) se descarta que exista una difusión significativa al líquido cefalorraquídeo. Estos resultados muestran que el problema de difusión a otras regiones cerebrales no es significativo y por tanto no explica la baja recuperación de la marca radioactiva. Además, la baja recuperación de la marca inmediatamente finalizada la administración de ésta al tejido, sugieren fuertemente la existencia de un problema metodológico en la inyección del marcador radioactivo. Con estos antecedentes, en otra serie de experimentos decidimos averiguar si la marca no era detectada debido a la resistencia que opone el tejido a la inyección, o si la radioactividad entraba a éste, pero no eramos capaces de medirla correctamente por un efecto de "apagamiento" (por el tejido) en el sistema de conteo de la radioactividad. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura # 6. Aquí se puede apreciar con claridad que el efecto de apagamiento del conteo de radioactividad por el tejido no existe. La inyección de la marca en el homogenado y en agua, posibilitó en ambos casos

INYECCION DE MET-³⁵S A -HOMOGENADO DE TEJIDO
 -TEJIDO AISLADO INTEGRO
 -H₂O

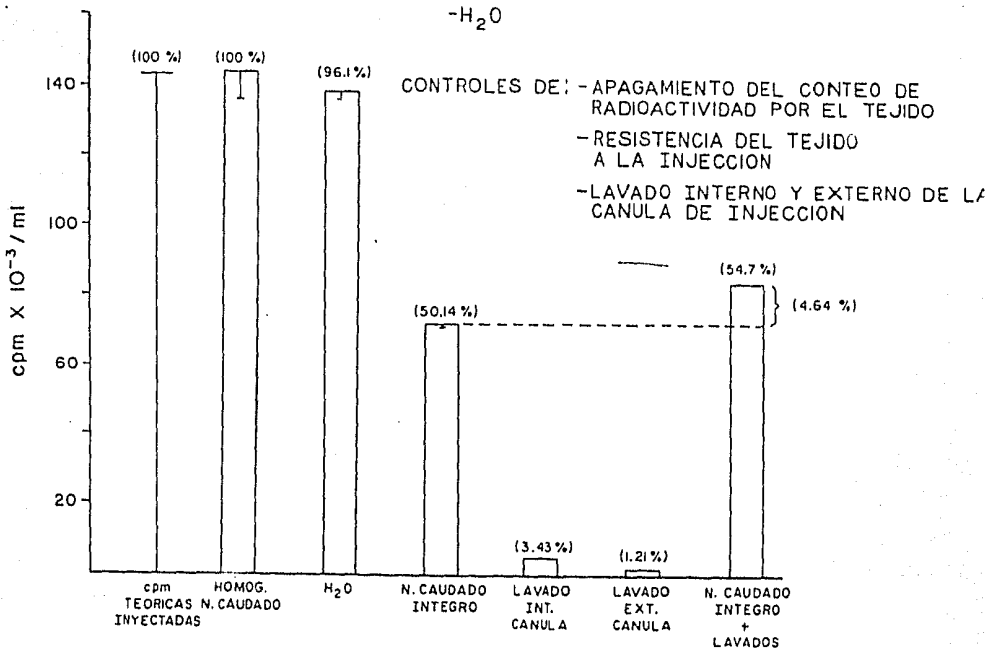


Figura # 6: El posible factor de apagamiento (quenching) que produciría el tejido homogenado sobre la recuperación de cuentas totales introducidas. Además se muestra el papel de la resistencia del tejido íntegro a la inyección y por ende a la recuperación de la marca radioactiva. El efecto de lavados externos e internos de la cánula posterior a la inyección sobre los niveles de recuperación son también presentados. Los porcentajes están calculados en relación al total teórico inyectado. Se inyectaron 143,603 CPMs de MET-35S en el núcleo caudado de ratas. El tiempo y volumen de inyección fueron 15 minutos y 3 ul respectivamente. Los valores corresponden al promedio de triplicados + D.S.M.

una recuperación de un 100%.

Por otro lado, se puede observar con claridad, que la resistencia del tejido a la inyección es un fenómeno que sí existe. En este caso se puso un cerebro en una placa Petri y se hizo la inyección sobre él. Como se puede apreciar la recuperación de la marca en el tejido esta ocasión fue de un 50%.

Teniendo claro que el problema radica en la resistencia que ofrece el tejido a la inyección, pensamos por tanto que sería conveniente cuantificar la cantidad de marca que queda en la cánula posterior a la inyección. Para tales efectos se hicieron varios lavados internos y externos de la cánula posterior a la inyección y se calculó el porcentaje de aumento que éste representa a la recuperación total de la marca radioactiva. El resultado mostró que el lavado interno contribuye con un 3,43% y el lavado externo con un 1,21% que sumado representa un 4,64% más de recuperación en relación al teórico inyectado (previo al lavado un 50,14% y posterior al lavado un 54,78%). Estos resultados que también se muestran en la Figura # 6 , indican que la cantidad de marca que se queda en la cánula posterior a la inyección en el tejido íntegro, no explica realmente la "fuga de marca radioactiva". Debo mencionar sin embargo que en experimentos recientes en los cuales se hirvieron con detergentes la cánula y tuberías de inyección, han mostrado que la cantidad de marca radioactiva que se queda en el sistema es bastante mayor que la que aquí se reporta. (A. Bayón, Com. Personal).

Nótese además, que estos experimentos mostraban también que

la "fuga del marcador radioactivo" no era por vía sanguínea. Los resultados con el cerebro sobre la placa Petri demuestran este punto y además definen el problema de resistencia a la inyección.

Con el propósito de solucionar el problema de resistencia a la inyección del precursor radioactivo, llevamos a cabo unos experimentos que se resumen en la Figura # 7. La gráfica muestra los resultados sobre la recuperación de MET-355 inyectada en el homogenado del núcleo caudado y en un núcleo caudado íntegro. Se realizaron las siguientes modificaciones de nuestro sistema de inyección:

A) El Volumen de Inyección: Es probable que el volumen usado sea muy pequeño y debido a la resistencia, sólo una parte de éste entrará al sistema. En estas condiciones no podríamos esperar una incorporación significativa de nuestro precursor. Para comprobar este punto, se usaron dos volúmenes distintos de inyección (3 y 10 ul) y la cantidad de cuentas y velocidad de inyección se mantuvieron constantes.

B) La velocidad de inyección: Es probable también que la velocidad de inyección usada (15 min) por ser muy lenta facilite que la marca se escape por un mecanismo de tensión superficial por las paredes externas de la cánula o por otra vía alternativa. Para comprobar este posible factor, se usaron dos distintas velocidades, 1 y 15 min y los demás parámetros se mantuvieron constantes.

Como se puede apreciar con claridad, ninguna de las dos distintas modificaciones a nuestro modo de inyección resultó

RECUPERACION DE MET - ³⁵S DEL TEJIDO (NUCLEO CAUDADO)
 VARIANDO LA VELOCIDAD Y EL VOLUMEN DE INYECCION.

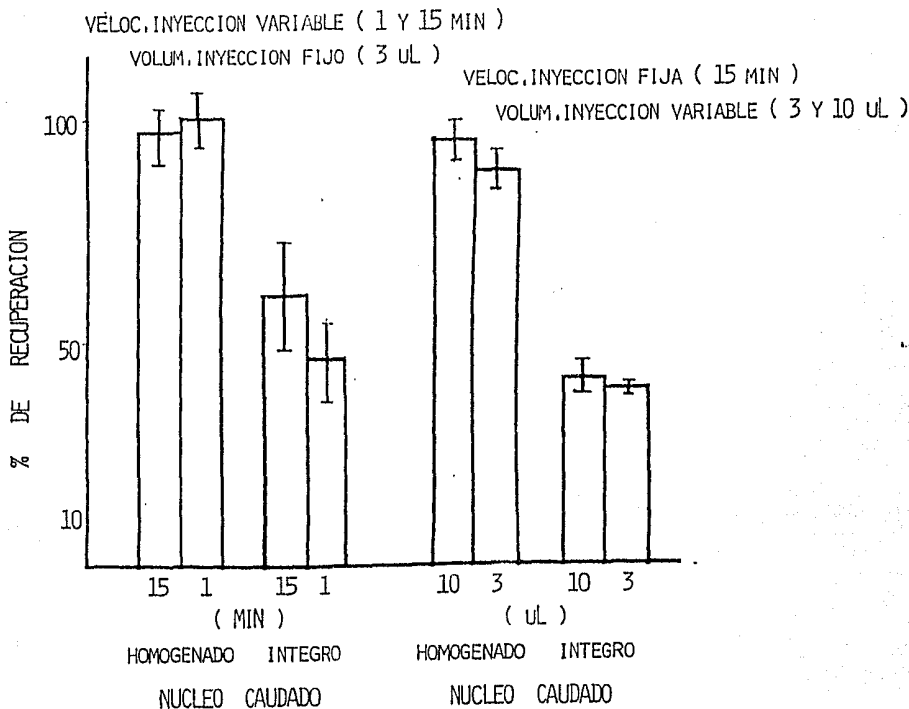


Figura # 7 : El efecto de la variación del volumen (3 o 10 ul) y la velocidad de inyección (1 o 15 min), sobre la recuperación de cuentas totales (MET-35S) del tejido (núcleo-caudado) íntegro y del tejido previamente homogenado. Los valores corresponden a promedios de triplicados + D.S.M. para cada caso.

en una solución al problema de recuperación de la marca en el tejido íntegro. Sin embargo hay un hecho que se ha podido observar a lo largo de los diferentes experimentos; el factor de pérdida del material radioactivo ha sido relativamente constante. La "pérdida" oscila alrededor de un 50% y este hecho representaría una solución parcial para nuestros objetivos.

Es importante mencionar en este momento que este problema no es nuevo, es un problema que incluso ha sido reportado (pero sin profundizar demasiado en él) por otros autores (Myers y col., 1971). En concreto, este problema se ha soslayado y la razón principal es que a pesar de la gran pérdida que existe, la cantidad que queda en el tejido es bastante constante, alrededor de un $50 \pm 10\%$. Este hecho se puede apreciar en casi todas las gráficas ya descritas. Este problema también ha sido observado cuando se han hecho inyecciones a otras regiones del cerebro como es el hipotálamo (R. Franco. Com. Personal).

A pesar de que estos experimentos no solucionaron el problema, el hecho de que se quede una cantidad relativamente constante en el tejido posterior a la inyección, posibilita afortunadamente el continuar con esta investigación, sabiendo que se trabaja con este factor de pérdida pero que por ser bastante constante se hace manejable.

El paso siguiente en nuestra investigación fue estudiar el curso temporal de incorporación de la marca radioactiva por el tejido y a su vez la incorporación de este precursor a proteínas cerebrales a lo largo del tiempo.

El primer experimento en relación a este curso temporal (que se muestra en la Figura # 8) fue muy alentador. Observamos que existe una incorporación a proteínas tisulares nada despreciable y ésta va en aumento por lo menos hasta las 4 hrs posterior a la inyección de la marca radioactiva.

Con estos resultados preliminares de incorporación de la marca radioactiva a proteínas tisulares, lo que evidentemente ameritaba era llevar a cabo un estudio a largo plazo de la incorporación de nuestro precursor a proteínas tisulares. En esta oportunidad estudiamos el curso temporal pero en esta ocasión hasta 72 hrs posterior a la inyección de la marca radioactiva. Con los resultados de este experimento obtendríamos una idea más cabal de la dinámica de incorporación de nuestro precursor a proteínas tisulares a lo largo del tiempo. Esos datos nos permitirían además, delimitar con mayor precisión el momento ideal para comenzar la perfusión (posterior a la inyección de la marca) y la posible duración de ésta, según el patrón de la incorporación de MET-35S a proteínas tisulares. La Figura # 9 muestra el curso temporal de la eliminación de la marca del tejido y el de la incorporación de ésta a proteínas cerebrales hasta las 72 horas. Como se puede apreciar en la gráfica, la curva de eliminación de la marca total en el tejido, muestra una pendiente muy pronunciada hasta las 6 hrs posterior a la inyección y una pendiente menor de ahí hasta las 72 hrs. Por su parte la curva de incorporación muestra un aumento pronunciado hasta las 6 hrs. (donde se encuentra el nivel más alto de incorporación) y posteriormente hasta las 72 horas

CURSO TEMPORAL DE:

- ELIMINACION DE MARCA TOTAL EN EL TEJIDO
- INCORPORACION DE MARCA A PROTEINA TISULAR

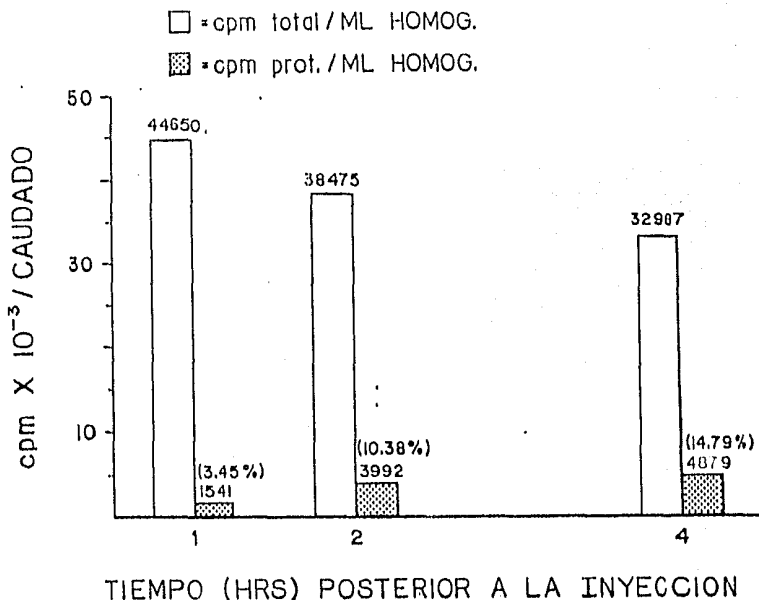


Figura # 8: El curso temporal (hasta 4 horas posterior a la administración del precursor) de la eliminación de la marca radioactiva (MET-35S) del tejido (núcleo-caudado) y la incorporación de la misma a proteína tisular. Se inyectaron 132.887 CPMs en un volumen de 3 ul durante 15 minutos. Los porcentajes mencionados corresponden al total de marca en proteínas en relación al total de marca en el tejido para cada tiempo.

CURSO TEMPORAL DE LA ELIMINACION DE LA MARCA RADIOACTIVA (MET - ³⁵S)
 Y SU INCORPORACION A PROTEINA TISULAR (NUCLEO CAUDADO) HASTA
 72 HORAS POSTERIOR A LA INYECCION DE UN PULSO UNICO.

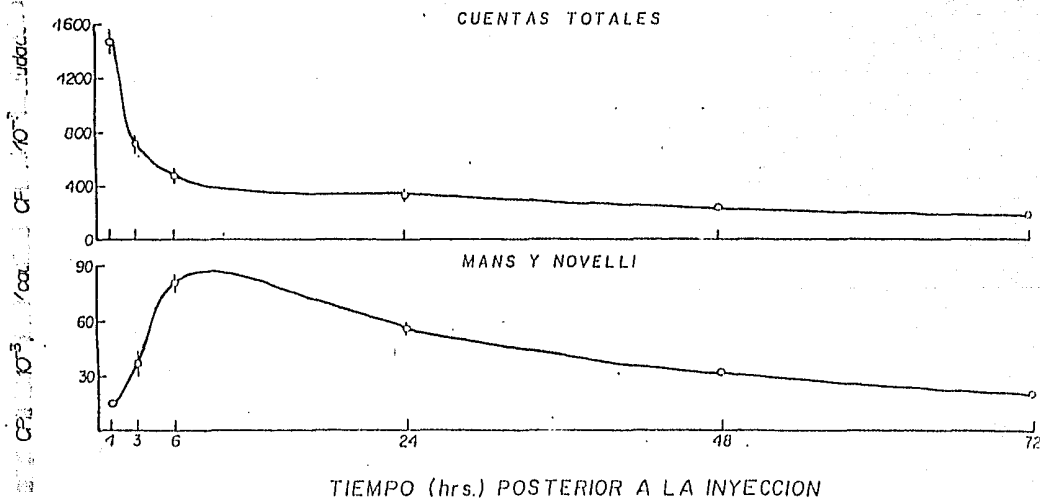


Figura # 9 : Se muestra el curso temporal de la eliminación de la marca radioactiva (MET-³⁵S) del tejido (núcleo-caudado) y su incorporación a proteína tisular, hasta las 72 horas posterior a la administración del precursor. Cada punto corresponde al promedio de 3 animales + D.S.M. Se inyectaron 3.6×10^{-6} CPMs en 3 μ l durante 15 minutos en el núcleo caudado derecho de cada rata.

una disminución lenta de la marca.

Ya que esta curva mostró un pico de incorporación a las 6 hrs., repetimos el experimento pero sólo hasta las 8 hrs. posteriores a la inyección, para poder visualizar con mayor resolución la curva en relación a su punto máximo.

La Figura # 10 muestra los resultados del curso temporal de la incorporación de MET-35S a proteína tisular hasta las 8 hrs. En esta ocasión se muestran los porcentajes de incorporación en relación al total teórico inyectado y en relación a la marca total encontrada en el tejido a los diferentes tiempos posterior a la inyección.

Se puede observar que el porcentaje de incorporación a los 15 min. posterior a la inyección, no dista mucho del valor máximo de incorporación que ocurre a las 6 hrs. Expresado en esta forma, la diferencia es de sólo un 1.35%. En otras palabras, el grueso de la incorporación ocurre inmediatamente posterior a la inyección del precursor y después el incremento es muy pequeño hasta alcanzar su nivel máximo.

Cuando estos resultados son expresados en relación a la marca radioactiva total encontrada en el tejido, la situación es diferente. La diferencia entre la incorporación a los 15 min y a las 6 hrs. es de un 11.14% , pero en realidad este es un aumento de 81.27 % nada despreciable. Además, se puede apreciar que esta curva tiene una dinámica diferente. El incremento a través del tiempo es más drástico y después de las 6 horas posterior a la inyección, continúa un pequeño aumento pero dando la impresión de que se ha llegado a un

CURSO TEMPORAL DE LA INCORPORACION DE MET-³⁵S A PROTEINA TISULAR

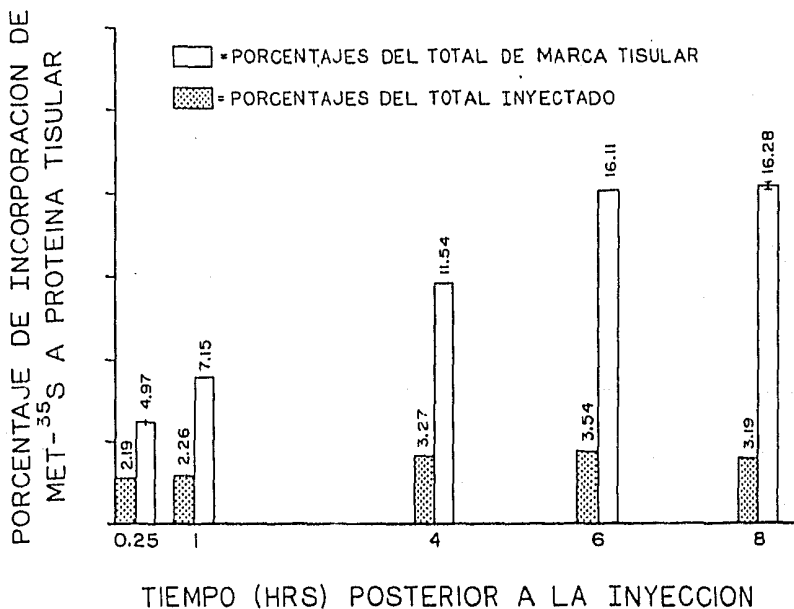


Figura # 10 : Los porcentajes de incorporación de MET-35S a proteína tisular (nucleo-caudado), en relación al total inyectado y al total de marca tisular, hasta 8 horas posterior a la inyección del marcador. Los valores son el promedio de 3 animales y sus D.S.M. Se inyectaron 143.675 CPMs de MET-35S en un volumen de 3 ul durante 15 minutos.

"plateau".

Quizás, es conveniente mencionar en este momento que el porcentaje de la marca radioactiva que está en proteínas, en el momento que la incorporación es máxima (es de un 16,28%) es bastante inferior al encontrado por otros investigadores que han usado otra vía de incorporación del precursor a proteínas del tejido nervioso. Gaidonte y Richter, (1957) mostraron que en animales jóvenes (50-100 gr) 3 horas posterior a la inyección intracisternal de MET-³⁵S, el 80% de la marca total del cerebro está en proteínas. Aunque nuestros resultados son bastante diferentes, la comparación no es la mejor ya que nosotros usamos animales adultos y bien se sabe que animales jóvenes tienen un metabolismo bastante más acelerado que animales de edad mayor, (Dunlop y col, 1977). Además debido a la inyección intracisternal, sus animales tienen todo el tejido circunventricular para metabolizar a la ³⁵S-MET y en nuestro caso solo unos milímetros de tejido. En todo caso, lo verdaderamente importante es que los niveles de incorporación sean suficientes para marcar proteínas que podrán ser libradas de las células y recogidas por nuestro sistema de perfusión.

Con el objeto de definir el período óptimo entre la inyección de la marca y la iniciación de la perfusión y por tanto optimizar la recolección de proteínas liberables de las células que han incorporado el precursor radioactivo, se realizaron perfusiones que empezaron 1/2, 2, 4 y 12 hrs. posterior a la inyección. Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos se muestran en la Figura # 11. Como se

puede observar, los niveles basales de proteínas marcadas en perfusiones que empezaron 1/2 y 12 hrs. posterior a la inyección del precursor, no son muy diferentes entre sí pero si lo son en relación a los niveles obtenidos con esperas de 2 y 4 hrs. Con estos datos decidimos hacer perfusiones, esperando 2 hrs. entre la inyección de la marca y el inicio de la perfusión con el objetivo de capturar la mayor cantidad de proteínas liberables de las células. En otras palabras a pesar de que la incorporación máxima ocurre alrededor de las 6 hrs posterior a la inyección, es claro que existe incorporación previa a este tiempo. El esperar solo 2 hrs posterior a la inyección del precursor radioactivo para iniciar la perfusión, nos permitirá posiblemente, coleccionar proteínas marcadas de manera mas eficiente sin perder aquellas posibles proteínas de rápida liberación. Así mismo, se decidió llevar a cabo perfusiones de 8 a 10 hrs de duración, período que esperamos sea suficiente para poder coleccionar una cantidad apreciable de proteínas de liberación rápida. Debo mencionar además, que es probable que exista una población de proteínas que incorporan el marcador radioactivo y que también se liberan de la célula, pero que el mecanismo de transporte hasta el sitio de liberación se lleve a cabo a una velocidad lenta y por tanto no entraría en el marco temporal de nuestros experimentos.

De aquí en adelante nos avocamos de lleno a realizar las perfusiones. La Figura # 12 muestra un patrón típico de una perfusión de 8 horas realizada en el núcleo caudado derecho

VALORES BASEALES DE PROTEINAS MARCADAS RADIOACTIVAMENTE OBTENIDAS EN EL CURSO DE PERFUSIONES, DEPENDIENDO DEL TIEMPO ENTRE LA INYECCION DE MET - ^{35}S Y LA INICIACION DE LA PERFUSION.

MANS Y NOVELLI

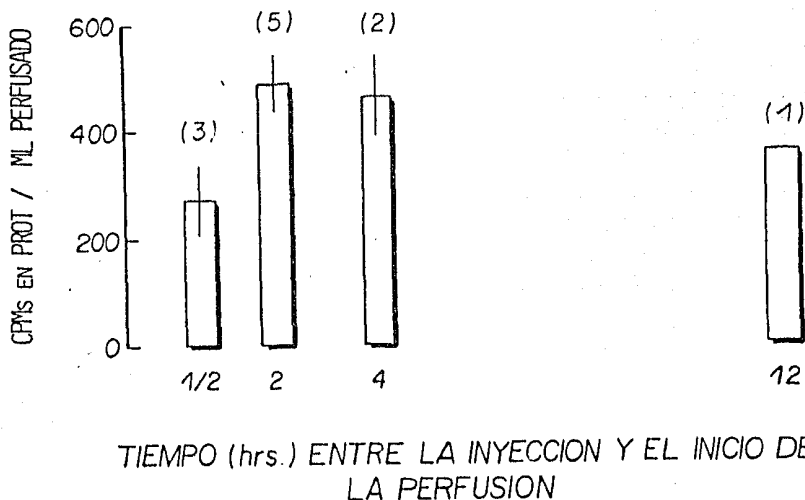


Figura # 11: Se muestran los valores basales obtenidos en proteínas marcadas con MET- ^{35}S (Mans y Novelli) comparando perfusiones que empezaron 1/2, 2, 4 y 12 horas posterior a la inyección del precursor radioactivo. Los números entre paréntesis señalan los animales analizados para cada dato. Los valores basales se obtuvieron calculando el promedio de CPMs en proteínas/ml perfusado a partir de la colección # 7 y excluyendo colecciones problemáticas. En todos los animales se inyectaron 143,675 CPMs en un volumen de 3 μl durante 15 minutos.

de una rata. Aquí se muestran los perfiles de los volúmenes obtenidos en cada colección, así como el perfil de cuentas totales, cuentas en proteínas (Mans y Novelli) y proteínas totales (Lowry).

Fuera del objeto de mostrar un patrón típico de una perfusión, esta gráfica posibilita mostrar además la sensibilidad de la metodología usada. Se puede apreciar que el volumen de la colección # 5 está bastante disminuido en comparación con el promedio general. Esto simplemente refleja un problema en el funcionamiento del sistema de perfusión (de ahí la gran importancia de la medición de volúmenes en cada colección). Nótese que este problema se refleja con claridad en cada uno de los otros parámetros cuantificados. Como se puede apreciar, la magnitud del problema en el funcionamiento del sistema de perfusión es bastante considerable, sobre todo cuando se observa al nivel alcanzado en la proteína medida por la técnica de Lowry, que no es muy diferente al nivel alcanzado en la primera colección cuyo nivel de proteínas totales (medido por la técnica de Lowry) refleja en gran parte, el daño causado en el tejido por la introducción de la cánula al sitio de perfusión. Cabe mencionar también que tanto los niveles de proteínas marcadas como los de proteína total y cuentas totales fueron por lo general (aunque no siempre) muy altos en la primera colección. Este hecho es consecuencia directa de la introducción de la cánula al sitio de perfusión. Esta estimulación mecánica y/o daño celular, produce que muchas

PERFUSION EJEMPLO

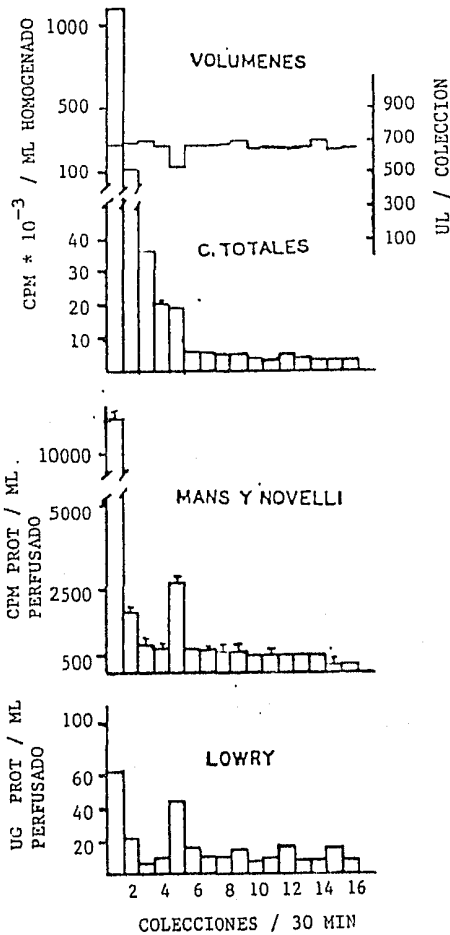


Figura # 12: Se muestran los perfiles de volúmenes (ul/colección), cuentas totales (CPM * 10⁻³ /ml homogenado), proteínas marcadas (CPMs en. proteínas / ml perfusado) y proteína total (ug proteína /ml perfusado) para cada colección en una perfusión ejemplo. En esta ocasión se obtuvieron colecciones cada 30 minutos. Nótese el efecto de una obstrucción en el sistema de perfusión previo a la colección # 5 sobre los perfiles obtenidos.

proteínas (Lowry) se liberen al medio extracelular, muchas de las cuales ya tenían el precursor incorporado (Mans y Novelli). Además, como lo muestra la curva de cuentas totales mucha marca aún no incorporada o diseminada del sitio de inyección, es recogida en esta colección.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo, se llevaron a cabo una serie de perfusiones en cuyo protocolo, se incluirían estimulaciones químicas (con una solución que contiene 50 mM de K⁺, pero cuya osmolaridad se mantuvo constante, disminuyendo la concentración de Na⁺) en dos colecciones (colecciones # 11 y # 18) y la estimulación mecánica (que se produciría por sacar y volver a meter la cánula en el sitio de perfusión) en la colección # 25. Todas estas perfusiones se realizaron en ratas y en el Nucleo Caudado derecho. La velocidad de flujo de estas perfusiones fue de 22 ul / min y se obtuvieron colecciones cada 15 minutos. Estas perfusiones se realizaron entre las 09:00 y las 18:00 horas.

Ya que no existe la certeza absoluta de que todas las ratas recibirían la misma cantidad del precursor radioactivo, los valores se expresaron también como porcentajes del total colectado. De esta manera, se le da el mismo "peso" a cada una de las perfusiones sin importar la cantidad de marca que se queda en el tejido.

La Figura # 13 muestra el promedio de los resultados obtenidos de perfusiones de 13 animales en los cuales los valores son expresados como porcentaje del total de marca

recolectada. Se indican las colecciones en las cuales hubo estimulación química y mecánica.

En la curva de cuentas totales, la colección # 1 muestra que más del 30% de la marca total obtenida a lo largo de la perfusión, se obtiene en esta colección. Este fenómeno es razonable, ya que un gran porcentaje de la marca radioactiva (MET-35S) aún no incorporada, así como marca incorporada a proteínas (que saldrían de las células por la estimulación mecánica o el daño celular producido por la introducción de la cánula) son obtenidos en esta colección. Posteriormente se aprecia una caída exponencial típica con unos pequeñísimos incrementos en las colecciones estimuladas.

Al observar lo que sucede con las proteínas marcadas de los perfusados (Mans y Novelli), se observan unos picos justamente en las "colecciones estimuladas", (colecciones # 11, 18 y 25). Sin embargo, estos picos no son "limpios". La colección anterior y posterior al estímulo parecen estar contaminadas por el efecto de la estimulación, ya sea química o mecánica. Una explicación a este fenómeno en lo que se refiere a la colección siguiente de la estimulación, radica en el hecho de que en la jeringa de colección existe un volumen muerto de aproximadamente 40 ul que contamina cada nueva colección, con lo ocurrido durante la colección anterior. Otra posibilidad es que debido a que el volumen muerto de la tubería era también de 15 min (a la velocidad de flujo y largo de tubería usado, el volumen de la tubería tarda 15 min en salir de ésta). Cualquier modificación en la velocidad del flujo o en su efecto, cualquier imperfección en

CURVA PROMEDIO DE PERFUSIONES N°13 (A)

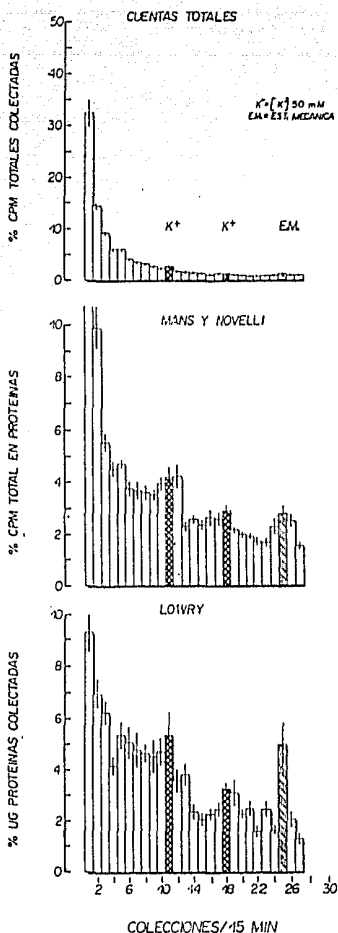


Figura # 13: Los perfiles de cuentas totales (% CPMs totales colectadas), proteínas marcadas (% CPMs total en proteínas) y proteínas totales (% ug proteínas colectadas) por colección, para la curva promedio de 13 perfusiones (13 animales) realizadas en el núcleo caudado derecho de cada rata. En las colecciones #s 11 y 18 se llevó a cabo la estimulación con alto potasio (50 mM) y en la colección # 25 se efectuó una estimulación mecánica (al sacar y volver a introducir la cánula en el sitio de inyección). Los datos están expresados como porcentajes del total obtenido al finalizar cada perfusión, para obviar posibles diferencias en la cantidad de marca radioactiva recibida por cada animal. Se obtuvieron colecciones cada 15 minutos y la velocidad de flujo usada fue de 22 ul /min. Los valores corresponden a promedios + D.E.M.

el control del tiempo de recolección puede llevar a producir el efecto observado.

Otra explicación podría ser que debido al gran volumen (330 ul) que contienen las tuberías del sistema, posibilita la difusión y por tanto, "contaminación" de las colecciones, (desde que se produce la estimulación en la rata hasta que llega a la jeringa de colección, pasan 7,5 min). Otra explicación por lo menos para la colección siguiente a la estimulación, es que el mecanismo de liberación sea tal que permita que proteínas se liberen con un retraso de tiempo bastante importante a partir del momento de la estimulación. Cabe mencionar sin embargo, que si la liberación de proteínas por estimulación con alto K^+ se lleva a cabo a través de un mecanismo similar a la liberación de neurotransmisores por alto K^+ , esta reciente explicación no sería válida ya que se ha demostrado que la liberación evocada por alto K^+ , produce una liberación rápida y las vesículas sinápticas son depletadas totalmente en cosa de unos pocos minutos.

En la gráfica de Lowry (proteínas totales) también sobresalen los picos en aquellas colecciones, las cuales fueron estimuladas. Aquí aparentemente el problema de la "contaminación" es menos evidente aunque también se aprecia.

Un punto importante de señalar, es que para esta serie de gráficas, se promediaron todas las 27 colecciones de los 13 animales promediados en esta ocasión. Esto implica que se incluyen también aquellas colecciones "problemas" es decir, colecciones donde probablemente algún factor externo a la

fisiología del animal (movimiento brusco del animal, mal funcionamiento del sistema de perfusión, obstrucción de la cánula), era probablemente el causante mas directo de los valores encontrados. Para la decisión sobre si existió o no un problema en una determinada colección, se analizaron en conjunto cada uno de los siguientes parámetros: volumen recolectado, cuentas totales, proteínas marcadas y proteínas totales; además se estudió el curso que llevaba la perfusión hasta ese momento y también lo que ocurrió posterior a esta colección. Con el análisis de todas estas observaciones, aunados a los comentarios descritos durante el transcurso de la perfusión por el experimentador, se tomaba la decisión sobre la existencia o no de una "colección problema". Ahora bien, cuando se eliminan de los resultados usados para promediar aquellas colecciones "problemas" (independientemente de la colección en que el problema ocurrió) y se vuelve a graficar, se obtiene el patrón que se observa en la Figura # 14.

Como se puede apreciar, el patrón de la curva de cuentas totales prácticamente no se modificó. En cambio, podemos observar que el patrón de proteínas marcadas sí cambió, pero sobre todo o fundamentalmente, en lo que concierne a la primera estimulación química. Cabe mencionar, que cuando se analizó la distribución de los problemas durante las perfusiones, por alguna causa desconocida, la mayor incidencia de problemas ocurrió justamente alrededor de esta primera estimulación química. Esto se refleja en la diferencia de la gráfica anterior a la presente (Fig # 13

CURVA PROMEDIO DE PERFUSIONES N°13 (B)

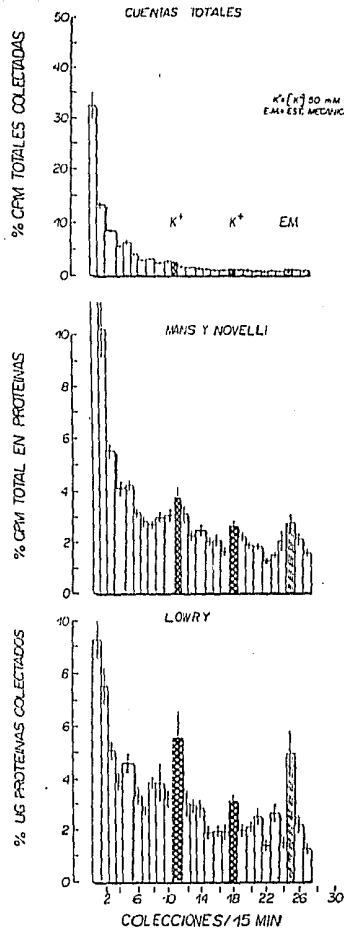


Figura # 14: Se muestran los mismos resultados de la figura #13, pero en esta oportunidad se han analizado solamente aquellas colecciones "buenas". Colecciones buenas son aquellas colecciones cuyos valores reflejan (con un alto porcentaje de probabilidad) la expresión de un evento fisiológico, quedando de esta manera excluido, algún factor externo (artefactual) como causante directo de tales niveles.

vs Fig # 14).

Cuando observamos lo que ocurre con los patrones de proteínas totales (Lowry), se puede apreciar con mayor claridad los efectos de la estimulación química sobre el tejido. Sin embargo, el patrón de la colección # 25 que refleja la estimulación mecánica del tejido no cambió. Resulta notorio que los efectos tanto de las estimulaciones químicas como el de la estimulación mecánica, se aprecian con mucho mayor claridad en los patrones de proteínas totales que en los patrones de proteínas marcadas radioactivamente.

Las Figuras #s 15 y 16 muestran las mismas gráficas, pero en estas gráficas se expresan los valores "crudos" es decir, en CPM's totales/ML perfusado; CPM's proteínas/ML perfusado y UG proteína/ML perfusado. La Figura # 15 muestra el promedio de todas las colecciones y la Figura # 16 solamente muestra el promedio de las fracciones "buenas". Es decir un promedio sin incluir aquellas "colecciones problemas".

Creo que es conveniente mencionar que en las figuras recién descritas se ha omitido la graficación de la actividad específica de las proteínas marcadas. La razón de esta omisión se basa en que la evaluación de la actividad específica pierde significancia cuando se analiza sobre la base de una alta heterogeneidad de poblaciones proteicas. Como se puede apreciar, los patrones de los diferentes parámetros de estas figuras (#15 y # 16) con valores crudos, no distan realmente de los patrones observados en las figuras de porcentajes.(# 13 y # 14).

CURVA PROMEDIO DE PERFUSIONES N=13 (C)

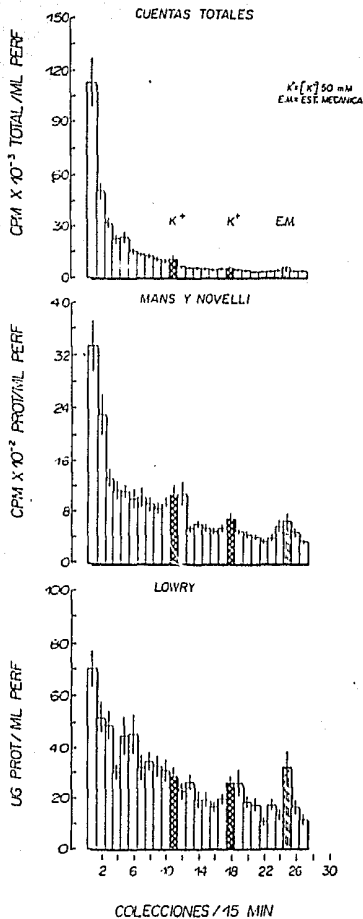


Figura # 15: Se muestran los valores presentados en las figuras anteriores, pero en esta oportunidad se graficaron los valores crudos. (cuentas totales (CPMs x 10⁻³/ ml perfusado), cuentas en proteínas (CPMs x 10⁻² / ml perfusado) y proteína total (ug/ml perfusado)). En esta oportunidad se incluyeron todas las colecciones.

CURVA PROMEDIO DE PERFUSIONES N°13 (D)

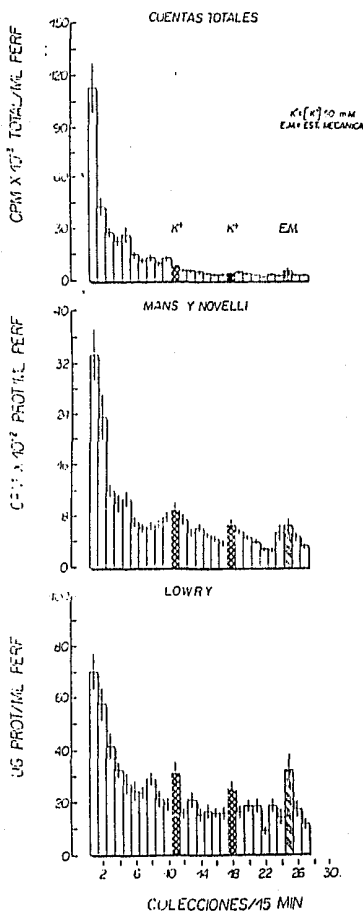


Figura # 16: Se muestran los perfiles para cuentas totales, cuentas en proteínas y proteína total (en valores crudos) como en la figura anterior (#15), pero en esta oportunidad se promediaron solamente las colecciones sin problemas.

La Figura # 17 muestra las curvas promedios de Mans y Novelli y la del Lowry, pero esta vez lo que quisimos averiguar era el porcentaje de aumento en relación a los niveles basales, definidos como el promedio de los niveles alcanzados por 4 colecciones precedentes a cada "colección estimulada". Si observamos lo ocurrido en la curva de Mans y Novelli, podemos observar que a pesar de que los aumentos sobre la basal no son impresionantes, la primera estimulación por K^+ , si produjo un aumento estadísticamente significativo ($p=0.03$). Sin embargo, y debido a una mayor variabilidad de los niveles basales, la segunda estimulación, que produjo un aumento muy parecido, aunque menor (28.6 vs 30.6% de la primera estimulación) no resultó ser un aumento significativo. La estimulación mecánica evidentemente produjo un aumento mayor por sobre los niveles basales y también alcanzó significancia estadística ($p=0.04$).

Al observar lo ocurrido en lo referente a proteínas totales, la gráfica de Lowry muestra que tanto las estimulaciones químicas (K^+ 50 mM) como la estimulación mecánica, produjeron niveles de liberación mayores que los obtenidos en proteínas marcadas. De la misma manera como ocurrió en la curva de Mans y Novelli (aunque en esta oportunidad es más clara) la primera estimulación con alto K^+ produjo niveles de liberación más altos (64.2 vs 48.6% en la 2a. estimulación) y estadísticamente significativos, ($p=0.03$).

Los niveles alcanzados producto de la estimulación mecánica son muy altos (148.7 % por sobre la basal) y también

EFFECTO DE LA ESTIMULACION CON ALTO K^+ Y LA ESTIMULACION MECANICA

SOBRE LOS NIVELES DE PROTEINAS MARCADAS Y PROTEINAS TOTALES.

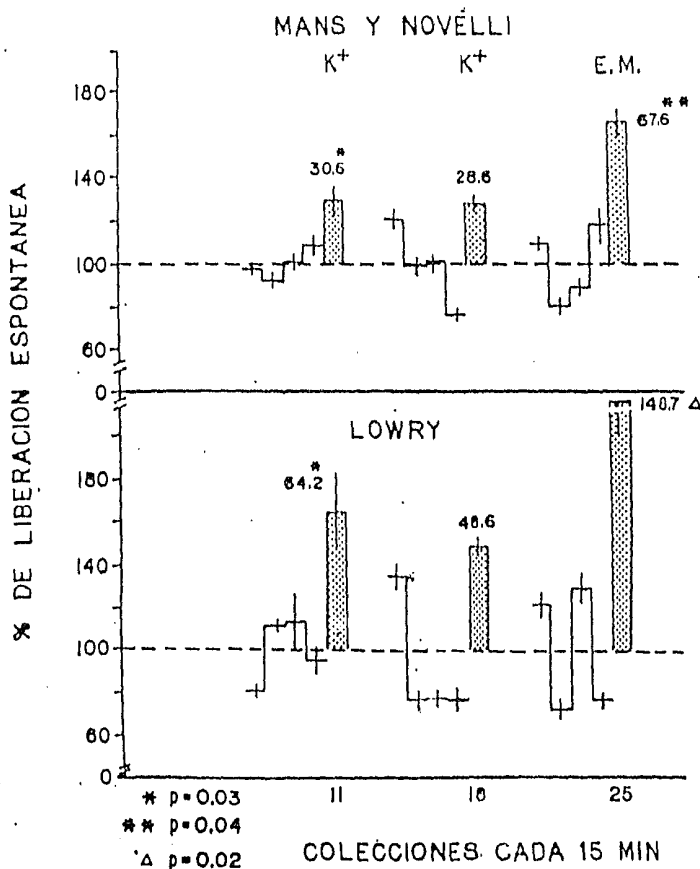


Figura # 17: En base a los valores obtenidos en la figura # 14, se analizaron los valores de las colecciones que reflejan el efecto de la estimulación química con 50 mM de K^+ (#s 11 y 18) y mecánica (# 25) en relación a los niveles de "liberación espontánea". Los niveles de liberación espontánea se definieron en base al promedio de los valores de cuatro colecciones que preceden a cada "colección estimulada". Estos valores basales se toman como 100 %. Este método de análisis fue adoptado de NIEOULLON y col, 1977. Los valores representan el promedio + D.E.M.

estadísticamente significativos, ($p = 0,02$).

Con los resultados obtenidos por la estimulación química, quisimos averiguar el papel del Ca^{++} en la liberación de proteínas evocada por altas concentraciones de potasio. Como se puede apreciar en la Figura # 18, cuando se efectúa la estimulación con potasio, pero omitiendo el Ca^{++} (Ca^{++} fue omitido del líquido de perfusión a partir de la colección # 14) no existe mayor diferencia a la estimulación hecha en presencia de Ca^{++} . Si comparamos esta estimulación química con la obtenida en la serie de perfusiones en la cual se usó Ca^{++} , incluso se podría decir que la omisión de Ca^{++} podría llegar a favorecer levemente la liberación de proteínas evocadas por alto potasio. En base a estos resultados, se podría sugerir que la liberación evocada por alto K^+ , de proteínas recién sintetizadas (marcadas radioactivamente) del núcleo caudado de la rata, no es dependiente de Ca^{++} . Sin embargo, cabe mencionar dos hechos que imposibilitan asegurar con certeza esta afirmación: 1) La gráfica es el resultado del análisis de sólo 3 experimentos, por lo que antes de aseverar algo valdría la pena duplicar o triplicar el número de experimentos; 2) A pesar de que Ca^{++} ha sido sacado del líquido de perfusión a partir de la colección # 15, no se puede afirmar que el Ca^{++} ha desaparecido del sistema, ya que los niveles de Ca^{++} endógeno no fueron manipulados. Cabe mencionar sin embargo, que resultados similares sobre el efecto de Ca^{++} , también en la liberación de proteínas ha sido ya reportado por algunos (Kaczmarek y Adey, 1975), pero de manera un poco diferentes por otros, (Greenfield y col, 1983).

EFFECTO DE LA OMISION DE Ca^{++} SOBRE
LOS NIVELES DE PROTEINAS MARCADAS.

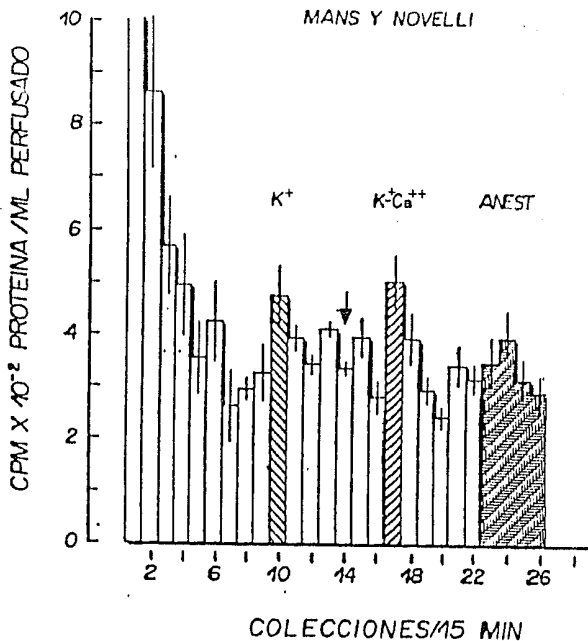


Figura # 18: Se muestran los perfiles promedio de proteínas marcadas (CPMs en prot / ml perf) de tres perfusiones de 6,5 horas de duración en el Núcleo Caudado de ratas. Se estudio el efecto de la omisión de Ca^{++} en el medio de perfusión, sobre la estimulación con K^+ (50 mM). A partir de la colección # 14 y hasta la colección # 17 (inclusive), Ca^{++} fue reemplazado por Mg^{++} en el medio de perfusión. A partir de la colección # 23, la perfusiones se continuaron con las ratas anestesiadas con Nembutal. (35 Mg / Kg) Los valores corresponden al promedio + D.S.M.,

La última parte de la gráfica muestra los efectos de la anestesia del animal sobre los patrones de liberación de proteínas marcadas. Como se puede observar, esta nueva condición fisiológica que duró solo una hora, no modificó realmente los niveles de proteínas marcadas y liberables de las células nerviosas. A pesar de que estos resultados con la rata anestesiada son preliminares, son bastante importantes, ya que sugieren que si el experimentador no está interesado en obtener correlatos bioquímicos (en este caso liberación de proteínas recién sintetizadas) con diferentes patrones de conducta o en relación al ciclo vigilia-sueño, el trabajar con un animal anestesiado (que sin duda ofrece mayores facilidades metodológicas) no parece oscurecer (al menos sobre este caso particular) la naturaleza de algunos eventos bioquímicos.

La Figura # 19 muestra los niveles de proteínas totales (Lowry) y proteínas recién sintetizadas Mans y Novelli en relación a distintos estados de vigilancia en la rata. Al mismo tiempo en que se perfundía el animal en el núcleo caudado, se obtenía un registro electroencefalográfico del ciclo sueño-vigilia. A pesar de que esta figura corresponde a una sesión de registro y perfusión en una rata y que por lo tanto no es más que un resultado parcial, pone de manifiesto dos hechos importantes:

- 1) Debido a que en la rata los períodos de sueño MOR tienen una duración muy corta (2-3 min), la correlación con niveles protéicos que se están obteniendo cada 30 min, se hace muy difícil. La obtención de colecciones más frecuentes

de perfusado (cada 3 min.) solucionaría este problema. Sin embargo, el volumen por colección en estas condiciones no alcanzaría para realizar los análisis de proteínas correspondientes. Por otra parte, aunque un aumento en la velocidad de flujo de perfusión podría representar una solución a este problema, esto puede llegar a tener consecuencias dañinas para el tejido perfundido (mayor erosión celular). Cabe mencionar sin embargo, que un análisis por hora de los estados de vigilancia y de los niveles protéicos podría mostrar de manera "gruesa" la correlación entre estos parámetros.

2) Aunque es posible que exista una correlación entre picos de proteínas (totales y recién sintetizadas) con períodos de sueño MOR, lo mencionado anteriormente dificulta un riguroso análisis de este posible fenómeno. Dos soluciones posibles, sin embargo existen: 1) Hacer las perfusiones en el gato, donde la duración de los períodos MOR son más largos (aproximadamente 6.5 min); y 2) Es ampliamente conocido que posterior a la privación de sueño MOR, tanto en humanos como en animales se sigue un período "rebote" donde la frecuencia, pero fundamentalmente la duración de los períodos MOR aumenta considerablemente. Perfusiones y análisis de proteínas totales y recién sintetizadas durante este período de "rebote de sueño MOR", podría ayudar a dilucidar la correlación y la causalidad entre liberación de proteínas cerebrales y el sueño MOR. Aún más existe también la alternativa de llevar a cabo estos experimentos en

PROTEINAS TOTALES, PROTEINAS MARCADAS Y ETAPAS DE SUEÑO EN LA RATA.

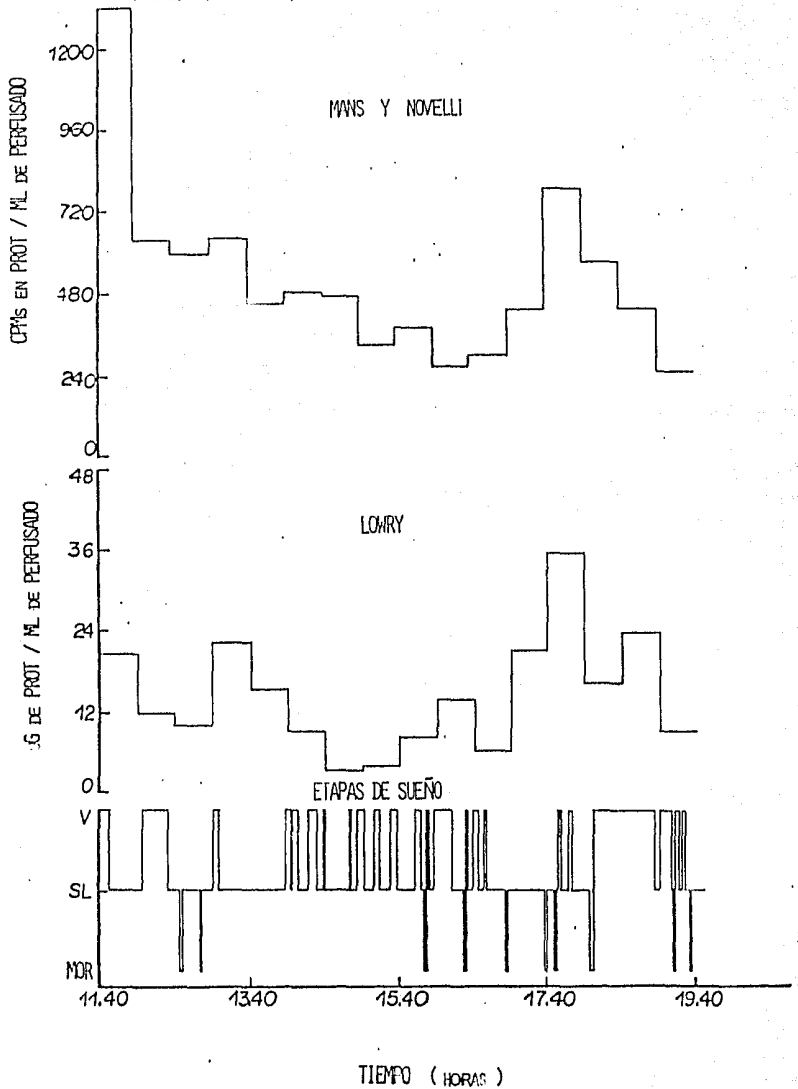


Figura # 19: Se muestran los perfiles de proteínas marcadas (CPMs en prot / ml perf) y proteínas totales (ug prot / ml perf) en relación a los distintos estados de vigilancia de una rata. Se inyectaron 17×10^{-6} CPMs en 15 minutos en el Núcleo Caudado derecho. La perfusión y registro empezaron de manera simultánea dos horas posterior a la administración del precursor y duraron ocho horas. Durante la perfusión se obtuvieron colecciones cada 30 minutos.

gatitos jóvenes ya que al igual como ocurre en todos los mamíferos estudiados a la fecha, los animales jóvenes o recién nacidos muestran no sólo altos porcentajes de sueño, sino que además una alta densidad de períodos MOR. Este hecho representa sólo una característica peculiar del desarrollo ontogenético del ciclo sueño-vigilia en mamíferos (Roffwarg y cols, 1966; Jouvet-Monnier, 1970). Aún más, ya que se sabe que el metabolismo general de proteínas está aumentado en animales jóvenes en comparación con adultos (Johnson y Lutgges, 1966) sugiere casi que esta es la preparación ideal para estudiar este fenómeno.

DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

El resultado mas importante de la presente investigación fué haber demostrado in-vivo, la liberación tisular de proteínas recién sintetizadas (marcadas radioactivamente) en el sistema nervioso central. Debo mencionar aqui que el concepto de "proteínas recién sintetizadas" es mas que nada una definición operacional y se refiere básicamente a proteínas que han incorporado el precursor radioactivo. Esta es practicamente la única información que se tiene de estas proteínas. La localización celular de la maquinaria sintética y el procesamiento intracelular hasta que se lleva a cabo la liberación, son algunos de los muchos aspectos aún desconocidos de estas proteínas. Sin embargo creemos que el poder detectar proteínas marcadas radioactivamente al poco tiempo posterior a la administración del precursor, permite referirnos a ellas como proteínas recién sintetizadas sin mayores problemas.

A pesar de que ya en otros estudios previos se mostraron evidencias de liberación in vivo de proteínas del sistema nervioso central, este estudio tiene como mérito principal el haber definido de manera clara, el origen tisular de por lo menos un grupo de proteínas encontradas en el LEC. Debido a que la administración del precursor radioactivo de proteínas (^3H -Met) se realizó en una región específica del SNC y ya que la colección de proteínas marcadas se obtuvo en ese mismo sitio anatómico, esta estrategia define claramente que fueron

esas y no otras células las que liberaron la proteínas marcadas al espacio extracelular. En otras palabras la administración de un marcador radioactivo de proteínas sobre un grupo específico de células, representó un prerequisite fundamental para poder definir con claridad el origen tisular de una cierta población proteica. Un marcaje indiscriminado de proteínas ya sea por vía sanguínea o a través del líquido cefalorraquídeo, imposibilitaría definir con certeza el origen de proteínas marcadas radioactivamente.

La estrategia experimental desarrollada en este estudio posibilita investigar el origen tisular de diferentes sustancias neuroactivas en distintas áreas del SNC. Además permite llevar a cabo un estudio sobre la dinámica de síntesis, transporte axonal y liberación de proteínas, neurotransmisores u otras moléculas que participen en eventos neuroquímicos del tejido nervioso.

Este trabajo muestra también que el sistema de perfusión con cánula push-pull resultó (ver discusión al respecto a continuación) ser una técnica adecuada para los propósitos ya mencionados. En esta oportunidad se estudió la liberación de proteínas marcadas radioactivamente del núcleo caudado de la rata. Aunque es posible que este fenómeno sea una propiedad general del tejido nervioso por el momento no es mas que una especulación.

Es importante recalcar que el uso de la cánula push-pull, por permitir perfusiones en regiones específicas del sistema nervioso posibilita llevar a cabo el estudio de la

liberación de proteínas de diferentes áreas del cerebro. Este estudio puede llevarse a cabo no solo en distintos estados de vigilancia del organismo in vivo, sino que además de forma simultánea en dos o más áreas específicas del sistema nervioso.

Antes de analizar la importancia, la posible trascendencia y líneas futuras a seguir de este estudio, deseo discutir algunos puntos en relación a la validación y el dominio de los hallazgos de este trabajo.

I.- ANALISIS DE NIVELES BASALES

Al observar las tres curvas promedio (Cuentas Totales, Mans y Novelli y Leary) de la figura #14 parece claro (aunque si existe variabilidad) que al momento de la primera estimulación química con alto K^+ (colección # 11) se ha llegado a la obtención de niveles basales relativamente constantes. Por otra parte resulta también claro (sobre todo al observar la curva de Mans y Novelli) que hubiera sido mejor esperar más tiempo entre una y otra estimulación, permitiendo así que el sistema alcance su nivel basal óptimo antes de proceder con la segunda estimulación. Este punto se hace aún más válido cuando se quiere comparar los niveles alcanzados por la estimulación (ya sea química ó mecánica) en relación a los niveles basales precedentes. Si estos niveles no son realmente valores basales, la comparación resulta un tanto artefactual.

nunque en otros estudios estos niveles se han descrito como reflejo de una liberación espontánea de las sustancias en cuestión (Michelot y Col, 1979), en nuestra opinión existe la alternativa de que estos niveles basales puedan, más que representar una continua liberación fisiológica espontánea de proteínas, ser consecuencia de una continua erosión de membranas celulares cuyos componentes proteicos, marcados radioactivamente o no, quedarían reflejados en nuestras determinaciones químicas.

Debo mencionar sin embargo que una erosión celular no parece ser la causante principal de este fenómeno ya que en varias oportunidades se midieron niveles de la enzima láctico deshidrogenasa (LDH), que es una enzima soluble la cual ha sido ampliamente usada como marcador de lisis, no detectándose niveles apreciables. Este punto ha sido también reportado en otra ocasión en que de manera sistemática se midieron los niveles de esta enzima a lo largo de cada perfusión (Bayón y Col. 1985). Afortunadamente para averiguar si la erosión membranaral existe como consecuencia del funcionamiento del sistema de perfusión, uno debería esperar que perfusiones con una velocidad de flujo mayor producirían una mayor erosión y por tanto un aumento en los niveles de proteínas ya mencionados. Aunque este experimento no se llevó a cabo, reportes de Bayón y Col. 1981 y Michelot y Col. 1979 han mostrado por un lado que aumentar en la velocidad de flujo produce una mayor variabilidad de los niveles basales pero paradójicamente, (Michelot y Col. 1979) una mayor

consistencia en los resultados. Interesante sería averiguar si esta mayor variabilidad, corresponde al fenómeno normal (y que con una velocidad de flujo lenta no se alcanza a percibir) o es simplemente un reflejo más fidedigno del proceso de erosión ya comentado. Estos últimos autores sugieren que aunque teóricamente es probable la existencia de erosión, el hecho de que los niveles basales no cambian a lo largo del tiempo (8 y 2 horas respectivamente) de la perfusión hace suponer que estos niveles sean reflejo de un fenómeno fisiológico normal.

En relación a los niveles basales de la curva de proteínas totales (LOWRY) debo hacer mención de algunos puntos importantes. A pesar de que como ya se mencionó, los niveles basales no son estrictamente estables y variaciones si se observan, un patrón cíclico claro de estos niveles proteicos no se observa a lo largo de casi 7 horas de perfusión. Sin embargo, esta afirmación esta basada solamente en la observación visual y sin llevar a cabo ningún tipo de análisis estadístico. Estos resultados son diferentes a los obtenidos por Drucker-Colin y Col. 1975b, donde patrones cíclicos de niveles de proteínas extracelulares se encontraron en la formación reticular mesencefálica (FRM) y en hipocampo (HIP) de gatos adultos. Sin embargo y sin profundizar demasiado, estas diferencias probablemente radican en que en esta ocasión no solo se usó como animal experimental a la rata sino que además el sitio de perfusión (núcleo caudado) fué distinto. En esa misma oportunidad Drucker-Colin y Col. 1975b encontraron además que la ciclicidad de los niveles

máximos de proteínas se correlacionaban de manera muy directa con altos niveles de sueños de movimientos colitares rápidos (NOR). Ya que el núcleo caudado, a diferencia de la FRM e HIP, no es una área que se le ha involucrado con los mecanismos que controlan el ciclo sueño-vigilia, puede ser una importante explicación en relación a la mencionada ausencia de ciclicidad de patrones proteicos obtenidos en este estudio.

II.- ANALISIS DE "COLECCIONES ESTIMULADAS"

"Colecciones estimuladas": son aquellas colecciones obtenidas durante la estimulación química con alto potasio (colecciones #s 11 y 18) y la colección que refleja el efecto de la estimulación mecánica (colección # 25.)

Al observar la curva promedio de proteínas totales o LOWRY (ver Fig # 14) resulta claro que la estimulación con alto potasio en la colección # 11, produce una liberación bastante mayor que la producida con posterioridad en la colección # 18 (64.2 y 48.6 % por arriba del valor basal obtenido del promedio de los niveles alcanzados por cuatro colecciones precedentes, respectivamente, (ver, Fig # 17)). Los niveles alcanzados por la estimulación mecánica mostrados en la colección # 25, (48.7 % por arriba del valor basal

promedio de los niveles de cuatro colecciones precedentes) pone de manifiesto el aumento en proteínas accesibles a la "captura" por el sistema de perfusión cuando se produce un daño tisular.

La curva promedio de proteínas marcadas o Mans y Novelli (ver. Fig # 14) muestra un patrón un poco diferente al mostrado en el de las proteínas totales. La relación existente entre los dos picos producto de las estimulaciones químicas es parecida sin embargo en este caso la diferencia entre ambos niveles es menor. En esta ocasión los aumentos sobre los niveles basales para las colecciones números 11 y 18 son 30.6 y 28.6 % respectivamente. (ver. Fig # 17) Como se puede apreciar, los porcentajes de aumento sobre niveles basales son menores que los obtenidos en la gráfica de proteínas totales. Una mayor dificultad en obtener picos de incremento claro, queda también demostrado en los niveles alcanzados por la estimulación mecánica en la colección # 25. A diferencia de lo obtenido en proteínas totales, en esta oportunidad se obtuvo un aumento de solo un 67.6 % sobre la basal, o sea menos de la mitad del incremento obtenido en niveles de proteínas totales. Una posible interpretación de estos resultados podría sugerir una gran eficiencia de la estimulación química con alto potasio en la liberación de aquellas proteínas endógenas que incorporaron el precursor radioactivo. El llevar a cabo este procedimiento dos veces en menos de dos horas produciría una considerable disminución de estas proteínas y consecuentemente el efecto de una

estimulación mecánica (que se sabe que es más drástico) posterior a las dos estimulaciones químicas, resulta en la obtención de niveles bastante menores de lo teóricamente esperados. En otras palabras si las proteínas marcadas radioactivamente son bastante sensibles a la estimulación con potasio, no es de extrañar que después de dos estimulaciones químicas con alto K^+ , la estimulación mecánica (a pesar de que puede producir lisis celular) no proporcione niveles de proteínas marcadas considerables. Existen sin embargo otras explicaciones alternativas: A.- La cantidad de proteínas sensibles a una manipulación depolarizante no es grande y por tanto, los incrementos sobre la basal son también reducidos. B.- Las proteínas recién sintetizadas sí son sensibles a alto K^+ , pero posterior a la liberación evocada por la introducción de la cánula (colección # 1) y las dos estimulaciones químicas, no son muchas las proteínas marcadas restantes y por tanto no es raro que éstas no sean visualizadas con mucha claridad sobre la basal.

Al comparar los niveles de las tres colecciones estimuladas para ambas curvas (Lowry, Mans y Novelli) con sus respectivos valores basales (el promedio de cuatro colecciones precedentes para cada caso, ver Fig # 17) se observa que diferencias estadísticamente significativas se obtienen solamente en las colecciones # 11 (primera estimulación con K^+) y # 25 (estimulación mecánica). Sin embargo independientemente de la significancia estadística de estos resultados, creo que resulta claro al observar las gráficas promedio (ver, Fig # 14, en especial la de Mans y Novelli)

que todas las estimulaciones produjeron un cambio importante en el curso temporal de la curva basal.

Creo además importante recordar que Sandberg y Col, 1980a, estudiando liberación de sustancias radioactivas en rebanadas de tejido (colículo superior) de conejo, mostraron que la liberación evocada por K^+ (56 mM) era muchísimo más prominente en sustancias solubles al tratamiento con TCA (correspondiendo probablemente a péptidos pequeños y/o a aminoácidos) que a sustancias de naturaleza proteica precipitadas por el TCA. Es probable que este fenómeno sea reflejo de la importante participación de diversos péptidos y aminoácidos como neurotransmisores en diferentes áreas del SNC. Así mismo, cabe la posibilidad de que la liberación de proteínas evocadas por alto K^+ , sea solo una consecuencia y a su vez dependiente de la liberación de péptidos y aminoácidos que participan directamente en el proceso de neurotransmisión. Así, proteínas se liberarían, pero de manera secundaria a la de neurotransmisores y quizás para actuar fundamentalmente como neuromoduladores. La liberación de AChE en paralelo con Dopamina de la Sustancia Nigra, podría representar un ejemplo de como la liberación proteica, podría jugar un papel de neuromodulador.

Vale la pena mencionar también que una liberación mayor de péptidos y aminoácidos que de proteínas, puede simplemente reflejar un mayor recambio de sustancias con capacidad de neurotransmisión que de neuromodulación.

III.- EFECTO DE CALCIO EN LA LIBERACION DE PROTEINAS

Aunque los resultados mostrados en relación al efecto de la omisión de calcio en el medio de perfusión sobre los efectos de la estimulación evocada por alto K^+ corresponden a solo tres experimentos, estos no dejan de ser interesantes. Según estos resultados, la liberación evocada de proteínas por alto K^+ no requiere la participación de Ca^{++} en este proceso. Estos datos sugieren por ende, que quizás la liberación de proteínas evocadas por esta manipulación depolarizante, no se lleva a cabo a través del proceso de exocitosis.

Paradójicamente al concepto de liberación de neurotransmisores dependiente de calcio, Sweadner, 1983 mostró en experimentos in-vitro que la liberación del NT en células del ganglio cervical de ratas, se podía evocar a pesar de la ausencia de Ca^{++} en el medio de cultivo cuando se usó la toxina de la araña viuda negra, el ionóforo A23187 y pCMBS como evocadores de estimulación. Sin embargo en este mismo estudio se mostró que la liberación evocada de proteínas membranales requerían siempre la presencia de calcio en el medio de cultivo para su liberación.

Por otra parte en 1975, Kaczmarek y Adey, mostraron que perfusiones de la corteza cerebral del gato con medios bajos en calcio (0.75mM) producen no solo el desarrollo de una actividad epiléptica espontánea al cabo de tres horas posterior a la perfusión, sino que también un aumento notable en la liberación de proteínas y en especial de glicoproteínas marcadas radioactivamente.

Estas evidencias recién mencionadas, sugieren por una parte que es posible obtener la liberación de proteínas que no sea dependiente de calcio y por otro lado, en base a las evidencias de Sweadner, pareciera que en esta oportunidad estaríamos evaluando algunas de las características de liberación de una población proteica cuyo origen no parece ser membranaral ni tampoco vesicular.

Cabe recordar también que Sandberg y col, 1980b mostraron en rebanadas de tejido que en ausencia de Ca^{++} , había una mayor liberación espontánea de material precipitado con TCA, pero que la liberación evocada con alto K^+ , si era dependiente de la presencia de este ión. Por otra parte ya mencionamos que usando también cánulas push-pull, Greenfield y col, 1983, mostraron que en ausencia de Ca^{++} , la liberación de proteínas totales evocadas por K^+ fue solo parcialmente abolida. Sin embargo en estas condiciones la liberación de AChE fue totalmente abolida.

Aunque el efecto de la omisión de Ca^{++} sobre la liberación espontánea de proteínas recién sintetizadas fue difícil de evaluar en esta oportunidad, (solo las colecciones # 15,16,17 y 18 fueron obtenidas en ausencia de Ca^{++}) en principio nuestros datos concuerdan con los resultados de Greenfield y col.,1983, que muestran que la omisión de Ca^{++} no altera los niveles de liberación espontánea de proteínas.

De este modo nuestros datos parecen concordar con unos pero nó con otros resultados obtenidos en sistemas in-vivo. Sin embargo distan con resultados obtenidos en sistemas in-vitro.

IV.- ORIGEN CELULAR DE PROTEINAS LIBERABLES

Los resultados del presente estudio muestran con claridad el origen tisular de las proteínas marcadas radioactivamente. Es obvio que al menos parte de estas proteínas no provienen ni de sangre, ni del líquido céfalo-raquídeo. En otras palabras el mostrar liberación de proteínas que han incorporado MET-35S en su estructura, define la existencia de una maquinaria sintética cuya localización no puede ser otra que la perteneciente a células nerviosas. Sin embargo, en ningún caso éste hecho, posibilita afirmar que la liberación proteica se origina de neuronas. Cabe la posibilidad no solo que la liberación de estas proteínas provenga de células gliales, sino que incluso es posible que estas proteínas hallan sido manufacturadas o sintetizadas en células gliales y transportadas posteriormente a neuronas y subsecuentemente liberadas de estas (para más detalles Gainer y Col. 1977). Como se discutíó anteriormente, de la misma forma que existen evidencias en sistemas in-vitro, sobre liberación de proteínas de origen neuronal, existen varios reportes en preparaciones in-vitro de células gliales donde se ha podido observar liberación de proteínas al medio de cultivo, (Arenander y De Vellis, 1980). Un apropiado estudio donde se lleve a cabo la identificación de las proteínas liberables junto con un estudio riguroso sobre la relación entre esta liberación de proteínas con la liberación de neurotransmisores, dará mayores conocimientos, que ayudarán a

dilucidar el origen celular de las proteínas.

Otro punto que quisiera discutir, que también tiene relación al origen celular de estas proteínas es el relacionado a la secuencia temporal de los eventos que en esta tesis se examinan.

Los resultados mostrados en esta tesis, sugieren fuertemente que la liberación de proteínas marcadas radioactivamente se agota o por lo menos disminuye antes que la liberación de proteínas totales. Este hecho se aprecia claramente al observar el efecto que tiene la estimulación mecánica del tejido (colección # 25) en las Figuras # 13-16, sobre la liberación de ambas poblaciones de proteínas.

Supongamos por un momento que el sitio de síntesis de las proteínas liberables es fundamentalmente el soma y el lugar principal de liberación son las fibras terminales del axón. Si este fuera el caso, las proteínas viejas (o no marcadas radioactivamente) se liberarían antes que la liberación de proteínas marcadas y recién sintetizadas, ya que éstas tendrían que "viajar" a través del transporte axonal antes de ser liberadas. Este proceso lleva consigo un tiempo no despreciable, sabiendo que la velocidad máxima de transporte rápido es de unos 400 mm/día. Cabe señalar además que después de un tiempo (lo suficiente como para que las proteínas marcadas lleguen a las terminales axónicas y se liberen) las proteínas marcadas se agotarían (ya que no hay un abastecimiento continuo del precursor) y nuevamente la liberación sería fundamentalmente de proteínas no marcadas. Los resultados de este estudio estarían apoyando este último

razonamiento, pero a la vez estaríamos asumiendo que la espera entre la inyección del precursor y el inicio y curso de la perfusión sería lo suficiente como para que una gran parte de las proteínas marcadas y liberables de la célula se encuentren en camino, cerca o ya en las terminales axónicas. Este argumento es plausible pero presenta algunos problemas importantes.

Datos morfológicos sobre la composición celular del Núcleo Caudado, señalan que este núcleo posee una población homogénea de células. Esto se refleja en la existencia de un tipo celular dominante que comprende un 96 % del total de neuronas. Estas células (Spiny I cells) son de tamaño medio (10 - 20 μ m de diámetro) y poseen 4 a 7 dendritas de tamaño también mediano y con muchas espinas que se concentran principalmente a unos 40 - 50 μ m del soma celular. De esta manera, las dendritas forman un " campo dendrítico esférico" con un radio aproximado de 250 μ m alrededor del soma.

El axón que en principio se pensó que era fino y corto, (Kemp y Powell, 1971) estudios más recientes parecen indicar que estas células poseen axones bastantes más largos y es posible que representen la mayor fuente de eferencias del Núcleo Caudado (Somogyi y Smith, 1979; Kitai, 1979). Si estas son las células que capturaron el precursor radioactivo (hecho muy probable debido a la premacia de estas células en el núcleo) y es el axón el sitio principal de liberación, implicaría probablemente que el sitio óptimo para recolectar estas proteínas sería la Sustancia Nigra y/o el Globus

Pallidus, que son al parecer los dos sitios más importantes donde llegan terminales axónicas de estas células. Esta alternativa también explicaría satisfactoriamente la poca eficiencia en la obtención de proteínas marcadas radioactivamente.

Existen otras alternativas que expliquen los resultados de este estudio?

Como ya se mencionó, actualmente existen buenas evidencias experimentales que sugiere la existencia de la liberación dendrítica no solo de neurotransmisores sino que también de proteínas (Greenfield y col, 1980). El transporte dendrítico involucraría un importante ahorro de tiempo en comparación con el transporte axonal. De esta manera una liberación dendrítica de proteínas marcadas, podría resultar una explicación razonable de nuestros resultados y explicaría porqué las proteínas marcadas radioactivamente se agotan antes que las proteínas no marcadas.

Vale la pena recordar que las dendritas podrían ser a la vez la fuente de síntesis y de liberación de proteínas marcadas.

Otra alternativa sería la liberación de proteínas de colaterales axónicas. De esta manera el transporte de las proteínas marcadas no solo se llevaría a cabo a distancias más cortas, sino que además la liberación se efectuaría en el mismo sitio anatómico.

Como apoyo a esta posibilidad, Groves en 1983, describió evidencias importantes sobre la existencia de redes de inhibición lateral que representarían quizás un importante sistema funcional de células estritales en el control de

movimientos voluntarios.

Finalmente quisiera mencionar que es posible, pero poco probable (ya que en su totalidad representan solo un aproximado 3 % del total de células de esta región) que parte de la liberación de proteínas marcadas radioactivamente podría estar dada por interneuronas que poseen axones finos y cortos. (Aspiny calls I, II y III).

En resumen, basado en los resultados de este estudio y en los datos morfológicos de las células del núcleo caudado, existirían al menos tres explicaciones posibles, que ayudarían a entender la relación temporal entre la liberación de proteínas marcadas y proteínas totales.

- 1.- Síntesis somal y/o dendrítica y liberación dendrítica.
- 2.- Síntesis somal y liberación de colaterales axónicos.
- 3.- Síntesis somal y liberación axonal de células con axones cortos. (interneuronas)

En cada uno de estos casos, sería posible entender porqué la liberación de proteínas marcadas radioactivamente disminuye o se agota antes que la liberación de la proteína total.

V.- IDENTIFICACION DE PROTEINAS LIBERABLES

Sin lugar a duda la identificación y caracterización físico-química de las proteínas liberadas es un siguiente paso a seguir que no merece objeción. Los métodos desarrollados para la identificación de proteínas,

fundamentalmente la electroforesis de dos dimensiones en geles de poliacrilamina con sodio dodecil sulfato (SDS) como una herramienta de alta resolución para separar complejas mezclas de proteínas según su masa y carga, será de indiscutible utilidad para la identificación de proteínas liberables. Es claro además que la identificación de estas proteínas no solo ayudará a resolver el origen celular de estas moléculas sino que posibilitará por ejemplo crear anticuerpos específicos en contra de estas proteínas y así se podrá mapear por técnicas inmunocitoquímicas la distribución anatómica de la mismas en el SNC. Estos avances nos permitirán estudiar además de manera más específica los mecanismos por los cuales estas proteínas se liberan y la correlación con la liberación de distintos neurotransmisores. Esta información ayudará sin duda a entender las aún desconocidas, funciones de estas proteínas liberables.

VI. - MECANISMOS DE LIBERACION DE PROTEINAS

Aunque en el presente trabajo no se abocó en detalle el estudio de los mecanismos de liberación de estas proteínas, creo conveniente mencionar algunas palabras al respecto.

Das importantes preguntas surgen (entre muchas otras) al pensar en la liberación de proteínas de células nerviosas: A. - Cómo difiere este tipo de secreción de la

conocida secreción neuroendocrina ? y B.- Cuál es la relación que existe entre los mecanismos de liberación de estas proteínas con los mecanismos de liberación de neurotransmisores.

Clásicamente las proteínas destinadas a la secreción, (haciendo referencia fundamentalmente a la neurosecreción endocrina), son empacadas en la célula y secretadas fundamentalmente a través del proceso conocido como exocitosis. La liberación por exocitosis, requiere necesariamente la existencia de una vesícula que contenga a la proteína y que interactúe con la membrana plasmática de la célula de tal manera que esta se abra y pueda verter el producto (proteico en este caso) hacia el exterior de la célula. Sin embargo podrían existir otros mecanismos alternativos por los cuales proteínas podrían ser liberadas:

1) Es posible que existan proteínas que no requieran de una vesícula para su liberación, sino que sean parte de esta y sean liberadas junto con la liberación del NT como parece ser el caso de la enzima dopamina β hidroxilasa.

2) Otra posibilidad es que la liberación se efectúe en concomitancia con la liberación del NT pero que no provenga de la vesícula sino que sea una forma soluble que se libere por una depolarización de la célula y por la salida del NT.

3) Si existen proteínas membranales liberables, sería probable que proteínas de la superficie externa de la membrana plasmática sean liberadas al medio extracelular por medio de un mecanismo de proteólisis gradual y limitada.

4) La liberación de proteínas membranales podría ocurrir como

parte de modificaciones de la membrana plasmática en el proceso de recaptura de la membrana vesicular, posterior a la exocitosis.

Afortunadamente ya han empezado a aparecer evidencias experimentales que ayudarán a dilucidar los mecanismos de liberación de neuroproteínas.

K. Sweadner en 1981, usando una preparación in-vitro que incluye neuronas del ganglio cervical superior de ratas jóvenes, mostró evidencias de liberación espontánea de proteínas de manera independiente de la liberación del NT. Además, mostró que la liberación evocada del NT por medio de una estimulación química (usando la toxina de la araña viuda negra) no evoca una liberación mayor de proteínas liberadas espontáneamente, sin embargo esta manipulación química produjo la aparición de un nuevo grupo de proteínas "evocadas" en el medio de cultivo.

En un estudio posterior Sweadner, 1983, estudió con más profundidad la aparente dependencia de la liberación evocada de proteínas con la del NT. La evidencia para la separación funcional de la liberación de proteínas y del NT quedó corroborada en la dependencia de Ca^{++} para la liberación. La liberación de proteínas evocadas siempre requirió la presencia de Ca^{++} en el medio de cultivo. Sin embargo el NT se liberó tanto por la toxina de la araña viuda negra como por sulfonato β -cloromercuribenzeno (pCBMS) y el ionóforo A 23187 en ausencia de calcio.

Como se puede apreciar ya han empezado a aparecer

evidencias que nos están ayudando a entender mejor los mecanismos de liberación de proteínas (ya sean evocadas o espontáneas) y su relación con la liberación del NT. Sin embargo este estudio aun está en su fase preliminar. En todo caso al parecer nos encontramos con al menos dos poblaciones de proteínas, unas con liberación espontánea y otras con liberación evocada. Además, como ya Sweadner lo demostró, la liberación de proteínas muestra un patrón diferente, dependiendo del NT principal de estas células. Será sin duda interesante investigar cómo la célula regula y ejecuta la liberación de estas distintas poblaciones proteicas. Aunque la investigación sobre los mecanismos de liberación de proteínas aún está en una fase muy preliminar quisiera mencionar algunos puntos importantes que el estudio de la liberación de AChE nos ha enseñado.

Como ya se mencionó existen varias evidencias que indican que esta enzima se libera de dendritas en la Sustancia Nigra (SN). Ya que la SN es un área pobre en ACh y ChAT (Silver, 1974), y rica en neuronas dopaminérgicas, se ha desarrollado la hipótesis de que la enzima y el neurotransmisor (que también se libera dendriticamente) podrían liberarse de manera paralela de tal manera que la proteína podría actuar como acarreador de dopamina (DA) y así proteger esta pequeña molécula hasta que al NT llegue a su máximo nivel de afinidad con su receptor.

Las evidencias que muestran que tanto DA como AChE no son almacenados en vesículas sino que se encuentran en el Reticulo Endoplásmico Liso (REL) de las dendritas (Henderson

y Greenfield, 1981; Mercer, 1979); que la liberación de ambas moléculas no es bloqueada por TTX (que normalmente bloquea la liberación axonal del NT) (Weston y Greenfield, 1985) y además que la liberación no se correlaciona con la frecuencia de disparo de las neuronas nigrostriatales. (Cuello y col, 1981; Glowinsky y Cheramy, 1981) sugiere por un lado que la liberación dendrítica es algo diferente de la axonal y por otro lado, que la liberación de algunas proteínas podrían tener un papel de neuromodulador (neuroprotector en este caso) de tal manera que pueda ser la base de la modulación espacio-temporal en el funcionamiento del SNC.

Lo anteriormente descrito abre una nueva puerta sobre el sitio de liberación de proteínas. Así en el futuro, para el desarrollo de una hipótesis integrativa sobre las funciones de la liberación de proteínas en el SNC, se tendrá que incluir la dualidad de liberación dendrítica y axonal.

VII.- POSIBLES FUNCIONES DE PROTEINAS LIBERABLES

Aunque acabamos de mencionar una posible función neuromoduladora, otra de las posibles funciones que se le podrían atribuir a proteínas liberadas de las células nerviosas sería la de tener una acción trófica, ya sea sobre la célula postsináptica o incluso sobre células aún más alejadas del sitio de liberación.

La demostración de la existencia de factor (s) trófico

(s) que se liberarían de células nerviosas, ha quedado en evidencia por el hecho de que como resultado de la degeneración de una fibra nerviosa, los elementos postsinápticos (o en el caso de una fibra nerviosa sensorial, su receptor sensorial) se dañan seriamente tanto en estructura como en función e incluso pueden hasta desaparecer. (Guth, 1968). Ya en 1951, Cook y col, mostraron que la extracción de un ojo, que causa una degeneración de las fibras ópticas primarias, se sigue de una atrofia de las células del cuerpo geniculado lateral, donde estas fibras terminan.

Tácitamente hemos hablado en breve del concepto "degeneración transneuronal", concepto que lleva implícito de manera clara, el posible papel trófico que algunas sustancias (o actividad) de la célula presináptica, estarían ejerciendo sobre el elemento postsináptico. Este fenómeno fue observado primeramente en el sistema visual y es justamente este sistema el que parece ser el más lábil a este tipo de manipulaciones. Aun más, en el sistema visual se ha observado la degeneración transneuronal ortógrada y retrógrada, o sea de la retina a la corteza visual y viceversa. Desgraciadamente aun no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares involucrados en este proceso, sin embargo dos posibles mecanismos se han propuesto: 1. Las neuronas (o las fibras musculares) requieren de una cierta cantidad de estimulación para sobrevivir, y por lo tanto al cortar el elemento presináptico, el nivel de estimulación sobre el elemento postsináptico queda reducido por debajo de

un valor crítico, resultando por lo tanto la degeneración.

2. Es la posibilidad ya que he mencionado sobre la liberación de sustancias tróficas como condición "sinequanon" para el normal funcionamiento del elemento postsináptico.

Quizás sea oportuno mencionar que células poseedoras de una función trófica, no necesariamente necesitarían liberar moléculas especiales, ya que es posible que simplemente los productos metabólicos de degradación en la terminal presináptica, sean los responsables de este efecto trófico, anulando de este modo la existencia de moléculas específicas con una función trófica.

Otro claro ejemplo se puede observar en la placa neuromuscular. Cuando un grupo de neuronas motoras que inervan un músculo se cortan, este se paraliza y los reflejos en los cuales él participa se pierden. Así, al interrumpir las interacciones tróficas entre la neurona y el músculo este último pierde su función. Es importante destacar que es muy probable que los dos mecanismos anteriormente mencionados estén muy relacionados entre sí, o sea que un cierto nivel de actividad sea el que permita la liberación de sustancias tróficas y por ende el mantenimiento de las funciones en las células postsinápticas.

Otra posible función de estas proteínas liberadas de las células nerviosas es que representen la base estructural de los mecanismos que posee la célula para controlar o mantener un "nivel óptimo" de homeostásis para su normal funcionamiento. Desgraciadamente evidencias experimentales

que confirman o desechen esta hipótesis no se han reportado. Sin embargo y solo a manera de especulación es posible que si tal mecanismo es común a todo tipo de células nerviosas, quizás esta liberación permitiría mantener los niveles energéticos controlados. Es posible que desde el punto de vista energético, sea más económico liberar las proteínas al espacio extracelular en vez de hidrolizarlas internamente así dejando a las proteasas del líquido extracelular, parte de esta función.

Por otra parte, los trabajos de Shashoua y col, 1985 demuestran que la liberación de ciertas proteínas al LEC puede representar un importante eslabón en complejas funciones del SNC. Así es probable que ciertas proteínas desencadenen un proceso neuronal que permita el establecimiento de un programa para la formación de memoria a largo plazo.

Una hipótesis más simple es que al menos parte de las proteínas liberadas de células nerviosas tengan un papel neuromodulador de la actividad neuronal. De esta manera actuarían en sinergismo con neurotransmisores y probablemente con neuropéptidos. Sin duda y como ya se mencionó los estudios de liberación dendrítica de DA y AChE en el sistema nigrostriatal a pesar de ser insuficientes, han conformado un cuerpo de conocimiento sólido, que sugiere fuertemente un importante papel neuromodulador de la liberación de neuroproteínas.

Otro punto que vale la pena mencionar se refiere a la posibilidad de que algunas proteínas liberadas tengan como origen

dos distintos compartimientos celulares. Así podríamos hablar de la función de la liberación de proteínas solubles citoplasmáticas y por otro lado de la función de proteínas liberables de origen membranar que probablemente han de llevar a cabo funciones distintas. Como ejemplo de lo antes mencionado es probable que la liberación de proteínas de origen membranar represente un mecanismo importante en el mantenimiento de la estructura celular, permitiendo un recambio dinámico de constituyentes membranales y quizás específicamente de receptores membranales. Así, no solo las proteínas se liberarían de dendritas y de axones sino que además dependiendo de su origen subcelular, estas proteínas tendrían probablemente funciones distintas. Otra pregunta no menos importante sería el conocer como la célula ejecuta el control temporal de este proceso de liberación. Brodsky en 1974, demostró en distintos sistemas que la síntesis de proteínas está modulada por un patrón rítmico. Sería pues interesante conocer si la liberación de proteínas esta bajo un control rítmico (dependiente o no de la síntesis proteica) o ocurre de manera tónica sin un patrón temporal determinado. Sin duda una de las preguntas básicas que habría que tratar de responder al respecto, sería averiguar la correlación entre niveles de actividad neuronal y niveles de liberación de proteínas.

Resumiendo, el presente trabajo tiene como mérito principal, el haber demostrado que existe una población de proteínas que se liberan de células nerviosas. Este hecho

pone de manifiesto que al menos parte de las proteínas encontradas en el líquido extracelular tiene un origen tisular. Sin embargo el tipo celular que libera estas proteínas ya sea de manera espontánea o evocada como consecuencia de una estimulación química o mecánica, es aún desconocido. A pesar de que la relación entre la liberación de estas proteínas con la liberación de neurotransmisores es aún incierta, datos preliminares sobre la dependencia de Ca^{++} para la liberación mostrados en este estudio, parecen señalar que quizás la liberación de neuroproteínas se lleva a cabo por mecanismos distintos.

Sin embargo, esta información es solo un pequeño inicio de un largo camino en el cual la identificación, la aislación, la distribución anatómica, caracterización físico-química y muchas otras propiedades de estas proteínas liberables del SNC, tendrán que conocerse antes de poder decifrar algunas de las posibles funciones de estas proteínas.

REFERENCIAS

- Adam, K (1980): Sleep as a restorative process and a theory to explain why. Progr. Br. Res. 53:289-306.
- Aghayanian, G. and Bunney, B.S (1973): Central dopaminergic neurons: Neurophysiological identification and responses to drugs. pp. 643-648. In: Frontiers in Catecholamine Research. Usdin, E and Snyder, S eds. Pergamon Press. Oxford.
- Ahonen, A., Myllyla, V. V and Hokkanen, E. (1978): Measurement of reference values for certain proteins in cerebrospinal fluid. Acta Neurol. Scand. 57: 358-365.
- Alvarez, J and Puschel, M (1972): Transfer of material from efferent axons to sensory epithelium in the goldfish vestibular system. Br. Res. 27: 265-273.
- Ambrom, T.R (1982): Differences in the distribution of specific glycoproteins among the regions of a single identified neuron. Br. Res. 272:489-505.
- Anderson, L and Anderson, N. (1977): High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. 74: 5421-5425.
- Anderson, N.G., Andreson, N.L., Tollaksen, S.L (1979): Proteins of human urine. I.- Concentration and analysis by two-dimensional electrophoresis. Clin. Chem. 25: 1199-1210.
- Appeltauer, G.S.L and Korr, I.M (1975): Axonal delivery of soluble, insoluble and electrophoretic fractions of neuronal proteins to muscles. Exp. Neurol. 46:132-146.
- Aquilonius, S.M and Eckernas, S.A (1976): Choline acetyltransferase in human CSF: Non-enzimatically and enzymatically catalysed acetylcholin synthesis. J. Neurochem 27:317-318.
- Arenander, A.T and De Vellis, J (1980): Glial-released proteins in cloned cultures and theirs modulation by hidro cortisone. Br. Res. 200:401-419.
- Arenander, A.T and De Vellis, J (1981a): Glial-released proteins: Two-dimensional electrophoretic identification of proteins regulated by hidro cortisone. Br. Res. 224:105-116.
- Arenander, A.T and De Vellis, J (1981b): Glial-released proteins: Influences on neuronal morphological differentiation. Br. Res. 224:117-127.

Aschroft, G.W., Dow, R.C., and Moir, A.T.B (1968): The activity transport of 5-hydroxyindol-3-phenylacetic acid and 3-methoxy-4-hydroxyphenyl acetic acid from a recirculatory perfusion system of the central ventricles of the unanaesthetized dog. J. Physiol. (Lond) 199:397-425.

Bancroft, W.D and Rutzler, J.E (1933): The agglomeration theory of sleep. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 19:73-79.

Banks, P and Hells, K (1965): The release of protein from the stimulated Adrenal Medulla. Biochem. J. 97:40-41.

Bantle, J.A and Hanh, W.E (1976): Complexity and characterization of polyadenylated RNA in the mouse brain. Cell, 8:139-150.

Bards, Y.A., Lindsay, R.M., Monard, D.D and Thoenen, H (1978): New factor released by cultured glioma cells supporting survival and growth of sensory neurons. Nature 274:818.

Barber, B.C., Parry, D.M., Field, P.M. and Raisman, G (1978): Electron microscope autoradiographic evidence for specific trans neuronal transport in the mouse accessory olfactory bulb. Br. Res. 152:293-302.

Bareggi, S.R and Giacobini, E (1978): Acetylcholinesterase activity in ventricular and cisternal CSF of dogs: Effect of Chlorpromazine. J. Neurosci. Res 3:335-339.

Barkai, A., Dudek, M., Brown, D.L and Fieve, K.K (1978): Application of an improved cerebroventricular perfusion technique in the rabbit: Effects of pentobarbital or haloperidol on monoamine metabolites and proteins in the perfusates. Neuropharmacol 17: 409-414.

Barkai, A (1979): Serotonin turnover in the intact rabbit brain: Relationship to extracellular proteins and modification by pentobarbital or haloperidol. J. Pharmacol. Exp. Therap 208:44-48.

Baundry, M., Bundman, H.C., Smith, E.K and Lynch, G.S (1981): Micromolar calcium stimulates proteolysis and glutamate binding in the rat synaptic membranes. Science 212:937-938.

Bartholini, G., Stadler, H., Gadea-Ciria, M.G and Lloyd, K.G (1976): The use of push-pull cannula to estimate the dynamic of acetylcholine and catecholamines within various brain areas. Neuropharmacol 15:515-519.

Bayón, A., Solano, S., Anton, B., Castaño, I and Diaz-Pentons, D (1985): Push-pull perfusions studies on the in-vivo release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides-enkephalines from the rat brain. pp: 69-93 In: In-vivo perfusion and release of neuroactive substances, eds: Bayón, A and Drucker-Colín, R. Academic Press.

Dayón, A., Rossier, J., Mauss, A., Bloom, F. E., Iversen, L. L., Ling, L. L. and Guillemin, R. (1981): In-vitro release of methionine-enkephaline from the rat globus pallidus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3503-3506.

Dayón, A., Schoemaker, W. J., Lugo, L., Azad, R., Ling, N., Drucker-Colin, R. R. and Bloom, F. E. (1981): In-vivo release of enkephaline from the globus pallidus. Neurosci. Lett. 24:65-70.

Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976): Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal. Chim. Acta 70:241-250.

Black, M. M. and Lalek, R. J. (1977): The presence of transfer RNA in the axoplasm of the Squid Giant Axon. J. Neurobiol. 8:229-237.

Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975): Transfer of proteins across membranes. J. Cell. Biol. 67:835-862.

Blobel, G. and Sabatini, D. D. (1971): Ribosome-membrane interaction in eukaryotic cells. pp:193-195. In: Biomembranes Vol. #2, Plenum Press, N. York.

Bobillier, P., Sakai, F., Seguin, S. and Jouve, M. (1974): The effect of sleep deprivation upon the in-vivo and in-vitro incorporation of tritiated amino-acid into brain proteins in the rat at three different age levels. J. Neurochem. 22:23-31.

Boch, E. (1978): Nervous system specific proteins. J. Neurochem. 30:7-14.

Bogoch, S. (1969): Proteins. pp:75-92. In: Handbook of neurochemistry Vol. I, Chap. 5. A. Lajtha (ed). Plenum Press N. York.

Bolan, J. P., Ingham, C. A. and Smith, A. B. (1984): The section-golgi-impregnation procedure. 3. - combination of golgi impregnation with enzyme histochemistry and electron microscopy to characterize acetylcholinesterase - containing neurons in the rat neostriatum. Neuroscience 12: 687-709.

Bray, J. J. and Harris, A. J. (1975): Dissociation between nerve - muscle transmission and nerve trophic effects on rat diaphragm using type B-botulinum-toxin. J. Physiol. (Lond) 234:53-77.

Brightman, M. N. (1968): The intracerebral movement of proteins injected into blood and cerebrospinal fluid of mice. Frog. Br. Res. 22:19-37.

Brimjoin, S. (1975): Stop-flow: A new technique for measuring axonal transport, and its application to the transport of dopamine- β -hydroxylase. J. Neurol. 6(4):377-394.

Brimijoin, S (1983): Molecules forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. Prog. in Neurobiol. 21:291-322.

Brodskii, V., Gusatinsky, N.V., Kogan, A.B and Nachaeva, M.N. (1974): Variations in the intensity of 3H-leucine incorporation into proteins during slow wave sleep and paradoxical phase of natural sleep in the cat associative cortex. Dokl. Akad. Nauk, SSSR 215:748-750.

Brodsky, W.Y (1975): Protein synthesis rhythm. J. Theor. Biol 55:167-200.

Brown, B.A., Nixon, R.A., Strocchi, P. and Marotta, C.A. (1981): Characterization and comparison of neurofilament proteins from rat and mouse CNS. J. Neurochem. 36:140-150.

Brown, M.S., Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L (1983): Recycling receptors: The round-trip itinerary of migrant membrane proteins. Cell 32:663-667.

Bunney, B.S., Walters, J.R., Roth, R.H. and Aghayanian, K (1973): Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. J. Pharmac. Exp. Ther. 560:560-571.

Butcher, L.L., Talbot, K and Bilesikjian, L (1975): Acetylcholinesterase neurones in dopamine-containing regions of the brains. J. Neurol. Transm. 37:127-153.

Butcher, L.L and Hodge, G.K. (1976): Postnatal development of acetylcholinesterase in the caudate-putamen nucleus and substantia nigra of the rats. Br. Res 106:223-240.

Cajal, R.S (1928): Degeneration and regeneration of the nervous system. Cambridge: Oxford Univ. Press. Vol I.

Cancalon, P (1979): Influence of temperature on the velocity and on the isotope profile of slowly transported labeled proteins. J. Neurochem 32:997-1007.

Carpenter, M.B. and Cowie, K.J (1985): Transneuronal transport in the vestibular and auditory systems of the squirrel monkey and the arctic ground squirrel. I. Vestibular System. Br. Res. 358:249-263.

Deccaralli, B and Hurlbut, W.P (1980): Ca²⁺ - dependent recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. J. Cell. Biol. 87:297-303.

Chase, T.N and Kopin, I.J. (1968): Stimulus - induces release of substances from olfactory bulb using the push-pull cannula. Nature 217:466-467.

Chee, P.Y and Dahl, J.L (1977): Measurement of protein turnover in rat brain. J. Neurochem 28:549-552.

Chee, P.Y and Dahl, J.L (1978): Measurement of brain protein turnover with ¹⁴C-sodium bicarbonate. J. Neurochem 30:1485-1493.

Cheramy, A., Leviel, V and Glowinsky, J (1981): Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. Nature 289:537-542.

Chikaraishi, D.M (1979): Complexity of cytoplasmatic polyadenylated and non-adenylated rat brain ribonucleic acid. Biochemistry 18:3249-3256.

Chou, S.C and Goldstein, A (1960): Chromogenic groupings in the Lowry protein determinations. Biochem. J. 75:109-115.

Chubb, I.W and Smith, A.D (1974): Increase concentration of an isoenzyme of acetylcholinesterase in rabbit cerebrospinal fluid after peripheral stimulation. J. physiol. (Lond) 242: 118-120.

Chubb, I.W and Smith, A.D (1975): Isoenzymes of soluble and membrane-bound acetylcholinesterase in bovine splanchnic nerve and adrenal medulla. Proc. Roy. Soc. Lond. B 191:245-261.

Chubb, I.W., Goodman, S and Smith, A.D (1976): Is acetylcholinesterase secreted from central neurones into the cerebrospinal fluid? Neurosciences 1:57-62.

Chubb, I.W., Hodgson, A.J and White, G.H (1980): Acetylcholinesterase hydrolyses substance P. Neuroscience 5:2065-2072.

Chubb, I.W., Greenfield, S.A. Hodgson, A.J (1980): Is acetylcholinesterase the biggest "neuropeptide" of them all? Neurosci. Lett. Supp II:56.

Clouet, D.H and Giadonte, M.K (1956): The changes with age in the proteins composition of the rat brain. J. Neurochem 1:126-133.

Clouet, D.H and Richter, D (1959): The incorporation of ³⁵S-labelled methionine into the proteins of the rat brains. J. Neurochem 3:219-229.

Comings, D.E (1982): Two dimensional gel electrophoresis of human brain proteins I. Techniques and nomenclature of proteins. Clin. Chem. 28:782-789.

Comings, D.E., Carraway, N.G and Pekkiva-Flagan, A (1982): Two dimensional gel electrophoresis of human brain proteins. II. Specific proteins and brain subfractions. Clin. Chem 28:790-797.

Cook, W.H., Wlaker, J.H and Barr, M.L (1931): A cytological study of transneuronal atrophy in the cat and rabbit. J. Comp. Neurol. **24**: 267-292.

Cosgrove, J.W., y col (1983): Synthesis of S-100 protein on free and membrane-bound polysomes of the rabbit brain. J. Neurochem. **40**: 806-813.

Cowie, R.J and Carpenter, M.B (1985): Transneuronal transport in the vestibular and auditory systems of squirrel monkey and the arctic ground squirrel. II., Auditory system. Br. Res. **358**: 264-275.

Cuello, A.C., Romero, E and Smith, A.D (1981b): In - vitro release of acetylcholinesterase from the rat substantia nigra. J. Physiol. **312**: 14p.

Davson, H (1970): Physiology of the Cerebrospinal Fluid ed. J.A Churchill, Lond.

Deamin, G.G and Gordon, M.W (1973): Chloramphenicol and cycloheximide-sensitive protein synthetic systems in brain mitochondrial and nerve ending preparations. J. Neurochem. **20**: 55-68.

Delgado J.M.R., Sinhadri, P and Apfelbaum, J (1962): Chronic implantation of chemitrodes in the monkey brain. Proc. XIII. Int. Union. Physiol. Sci Vol 2: 1090.

Delgado, J.M.R., DeFeudis, F.V., Roth, R.H., Ryogo, B.K and Mitraka, B.M (1972): Dialitrode for long term intracerebral perfusion in awake monkey. Arch. Int. Pharmacol. **198**: 7-21.

De Potter, W.P., De Schaeppdryver, A.F., Moerman, E.J and Smith, A.D. (1969): Evidence of the release of vesicle-proteins together with adrenaline upon stimulation of the splenic nerve. J. Physiol., Lond. **204**: 102-104.

De Potter, W.P., Smith, A.D and De Schaeppdryver, A.F (1970): Sub cellular fractionation of splenic nerve: ATP, chromogranin A and dopamine B hydroxylase in noradrenergic vesicles. Tissue and Cell **2**: 529-546.

Devillers-Thiery, A., Girandat, J., Bentaboulet, M and Changeux, J.P. (1983): Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha-subunit of torpedo acetylcholine receptor: A model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. Proc. Natl. Acad. Sci USA **80**: 2067-2071.

Deutsch, D.G., Schechter, N., Brecha, G., Guitschke, W., Schulman, P., Cne, M., Gazzaniga, M. and Simpson, M.V (1980): Analisis of proteins levels and synthesis after learning in the split-brain pigeon. Br. Res. **193**: 135-145.

Drager, U.C. (1974): Autoradiography of tritiated proline and fucose transported transneuronally from the eye to the visual cortex in pigmented and albino mice. Br. Res. 82:284-292.

Dray, A. (1979): The striatum and substantia nigra: a commentary on their relationships. Neurosci. 4:1407-1439.

Droz, B. and Leblond, C.P. (1962): Migration of proteins along the axons of the sciatic nerve. Science 137:1047-1048.

Droz, B. and Leblond, C.P. (1963): Axonal migration of proteins in the central nervous system and peripheral nerves as shown by radioautography. J. Comp. Neurol. 121:325-346.

Droz, B. (1973): Renewal of synaptic proteins. Br. Res. 62:383-394.

Droz, B., Koening, H.L. and Di Giamberardino, L. (1973): Axonal migration of proteins and glycoproteins to nerve ending. I. Radioautographic analysis of the renewal of proteins in nerve ending of chicken ciliary ganglion after intracerebral injection of ³H-Lysine. Br. Res. 60:93-127.

Drucker-Colin, R.R., Spanis, C.W., Hunyad, J., Sassin, J.F. and McGough, J.L. (1975a): Growth hormone effects on sleep and wakefulness in the rat. Neuroendocrinology 18:1-8.

Drucker-Colin, R.R., Spanis, C.W., Colman, C.W. and McGough, J.L. (1975b): Changes in proteins in perfusates of freely moving cats: relation to behavioral states. Science 187:963-965.

Drucker-Colin, R.R. and Spanis, C.W. (1975c): Neurohumoral correlates of sleep: increase of proteins during rapid eye movement sleep. Experientia 31:551-552.

Drucker-Colin, R.R. and Gutierrez, M.C. (1976): Effects of forebrain lesions on release of proteins from the midbrain reticular formation during the sleep-wake cycle. Exp. Neurol 52:339-344.

Drucker-Colin, R.R., Zamora, J., Bernal-Pedraza, G. and Sosa, B. (1979): Modification of REM sleep and associated phasic activities by protein synthesis inhibitors. Exp. Neurol 63:458-467.

Drucker-Colin, R.R., Tuena de Gomez-Poyou, C., Gutierrez, M.C. and Dreyfus-Cortez, G. (1980): Immunological approach to the study of neurohumoral sleep factors, effects on REM sleep of antibodies to brain stem proteins. Exp. Neurol 69:562-575.

Duffy, C., Teyler, T.J. and Shashoua, V.E. (1981): Long term potentiation in the hippocampal slice: Evidence for stimulated secretion of newly synthesized proteins. Science 212:1148-1151.

Duncan, R. and McConkey, E.H (1962): How many proteins are in a typical mammalian cell? Clin.Chem. 28: 749-755.

Dunlop, D.S., Van-Elden, W and Lajtha, A (1975): A method for the measuring brain protein synthesis rates in young and adults rats. J.Neurochem. 24: 337-344.

Dunlop, D.S., Van-Elden, W. and Lajtha, A (1977): Developmental effects on protein synthesis rates in regions of the CNS *in-vivo* & *in-vitro*. J.Neurochem. 29: 939-945.

Dwyer, B.E., Donatoni, P and Wasterlain, C.G (1982): Measurement of local rates of brain protein synthesis by quantitative autoradiography. Neurochem.Res. 7(12): 1507-1514.

Edstrom, A (1966): Amino acid incorporation in isolated Mauthner nerve fibre components. J.Neurochem. 13: 315-321.

Edwards, J.A and Hines, J.F (1982): Rapidly transported protein released from nerve and isolated with myelin. Br.Res. 239: 507-517.

Edwards, J.J., Tollaksen, S.L and Anderson, N.G (1981): Proteins of human semen. I. Two-dimensional mapping of human seminal fluid. Clin.Chem. 27: 1035-1040.

Elam, J.S and Agranoff, B.W (1971): Rapid transport of proteins in the optic system of the goldfish. J.Neurochem. 18: 375-387.

Eylar, E.H (1965): On the biological role of glycoproteins. J.Theor. Biol. 10: 89-113.

Fabian, R.H and Coulter, J.D (1985): Transneuronal Transport of Lectins. Br.Res. 344: 41-48.

Feit, H., Dutton, G.R., Barondes, S.H and Shelanski, M.L (1971): Microtubule proteins: Identification in and transport to nerve endings. J.Cell Biol. 51: 133-147.

Fillenz, M (1971): Fine structure of noradrenaline storage vesicles in nerve terminals of the rat's vas deferens. Phil.Trans.Roy.Soc.Lond. B 261: 319.

Fishman, R.A (1980): Cerebrospinal Fluid in Diseases of the nervous system, pp:168-252, ed. W.B Sanders.

Fox, R and Hilton, S (1958): Bradikinin formation in human skin as a factor in heat vasodilatation. J.Physiol (Lond) 142: 219.

Fricke, U (1975): Tritiosol: A new scintillation cocktail based on Triton-x-100. Anal.Biochem. 63: 555-558.

Fuenmayor, L., Smith, A. D and Vogt, M (1976): Acetylcholinesterase in perfusates of cat's cerebral ventricles. J.Physiol (Lond) 204: 58-59p.

Gaddum, J.H. (1961): Push - Pull Cannulae. J. Physiol. (Lond), 155:1-2p.

Gaidonte, M.K. and Richter, D. (1956): The metabolic activity of the proteins of the brain. Proc. Roy. Soc. B145:83-89.

Gaidonte, M.K. and Richter, D. (1957): Metabolism of the Nervous System pp:449-455. ed. D. Richter. Pergamon Press., Lond.

Gainer, H., Tasaki, I. and Lasek, R.Y. (1977): Evidence for the glia-neuron protein transfer hypothesis from intracellular perfusion studies of squid giant axon. J. Cell. Biol. 74:524-530.

Gambetti, P., Autilio-Gambetti, L.A., Gonatas, N.K. and Shafer, B. (1972): Protein synthesis in synaptosomal fractions. Ultrastructural radioautographic study. J. Cell. Biol. 52:526-535.

Garlich, P.J. and Marshall, I. (1971): A technique for measuring brain protein synthesis. J. Neurochem. 19:577-583.

Geffen, L.B., Livett, B.G. and Rush, R.A. (1969): Immunological localization of chromogranins in sheep sympathetic neurons and their release by nerve stimulation. J. Physiol. (Lond) 204:58-59p.

Gewirtz, G.P. and Kopin, J.J. (1970): Release of dopamine B hydroxylase during cat splenic nerve stimulation. Nature 227:406-407.

Gilbert, S.P., Alien, R.D. and Tytell, M. (1982): Evidence for the transfer of vesicles from glia to axon. J. Cell. Biol. 95:11a.

Globus, A., Lux, H.D. and Schubert, P. (1968): Somadendritic spread of intracellularly injected tritiated glycine in cat spinal motoneurons. Br. Res. 11:440-443.

Goldstein, R.S., Weiss, R.R. and Schwartz, J.H. (1982): Intraneuronal injection of horseradish peroxidase label glial cell associated with the axon of the giant metacerebral neurons of *Aplysia*. J. Neurosci 2:1567-1577.

Gordon, M.K., Bench, K.G., Deamin, G.G. and Gordon, H.N. (1968): Histochemical and biochemical study of synaptic lysosomes. Nature 207:520-527.

Gorenstein, C., Bundman, M.C., Law, P.J., Olds, J.L. and Ribak, C.E. (1985): Dendritic transport I.- Colchicine stimulates the transport of lysosomal enzymes from cell bodies to dendrites. J. Neurosci 5(8):2009-2017.

Goranstein, C and Ribak, C.E (1985): Somatofugal movement of neuronal lysosomes induced by colchicine: Evidence for a novel transport system in dendrites. J. Neurosci 5(8):2018-2027.

Goridis, C and Neff, N.H (1971): Monoamine oxidase: an approximation of turnover rates. J. Neurochem 18:1673-1682.

Grafstein, B (1971): Transneuronal transfer of radioactivity in the Central Nervous System. Science 172:177-179.

Grafstein, B and Laureno, R (1973): Transport of radioactivity from eye to visual cortex in the mouse. Exp. Neurol 39:44-57.

Greenfield, S.A., Chubb, I.W and Smith, A.D (1978): The effect of Chlorpromazine on the concentration of acetylcholinesterase in the cerebrospinal fluid of rabbits. Neuropharmacol 18:127-132.

Greenfield, S.A and Smith, A.D (1979): The influence of electrical stimulation of certain brain regions on the concentration of acetylcholinesterase in rabbit cerebrospinal fluid. Br. Res 177:445-459.

Greenfield, S.A., Cheramy, A., Leviel, V and Glowinsky, J (1980): In vivo release of acetylcholinesterase in the rat substantia nigra and caudate nuclei. Nature 284:355-357.

Greenfield, S.A., Stein, J.F., Hodgson, A.J and Chubb, I.W (1981): Depression of nigral pars compacta cell discharge by exogenous acetylcholinesterase. Neurosci 6:2287-2295.

Greenfield S.A and Shaw, S.W (1982): Release of acetylcholinesterase and aminopeptidase in vivo following infusion of amphetamine into the substantia nigra. Neurosci 7:2883-2893.

Greenfield, S.A., Cheramy, A and Glowinsky, J (1983a): Evoked release of proteins from central nervous system in vivo. J. Neurochem 40:1048-1057.

Greenfield, S.A., Grunewald, D.F and Shaw, S.G (1983b): Origin of various enzymes released from substantia nigra and caudate nucleus: Effects of 6-hydroxidopamine lesion of the nigro-striatal pathway. J. Comp. Neurol 214:87-92.

Greenfield, S.A and Weston, J (1984): Acetylcholinesterase release from rat nigro-striatal cells following infusion of haloperidol into the substantia nigra. J. Physiol. (Lond) 351:23p.

Greenfield, S.A., Chubb, I.W., Grunewald, R.A., Henderson, Z., May, J. Portnoy, S., Weston, J and Wright, H.C (1984): A non-cholinergic function for acetylcholinesterase in the substantia nigra: Behavioral evidence. Exp. Br. Res 54:513-520.

Groves, P (1983): A theory of the functional organization of the neostriatum and the neostriatal control of voluntary movements. Br. Res. 5:109-132.

Guroff, G (1964): A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of the rat brain. J. Biol. Chem. 239:149-155.

Guth, L (1968): "Trophic" influences of nerve on muscle. Physiol. Rev. 48:649-687.

Hammerschlag, R., Stone, G.C., Bolen, F.A., Lindsey, J.P. and Ellisman, M.H (1982): Evidence that all newly synthesized proteins destined for fast axonal transport pass through the Golgi Apparatus. J. Cell. Biol. 93:568-575.

Henderson, V.E (1933): On Brancroft's theory of anesthesia, sleep and insanity. Am. J. Psychiat. 13:256-260.

Henderson, Z and Greenfield, S.A (1984): Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in substantia nigra: a comparison between rat and guinea pig. J. Comp. Neurol. 220:278-286.

Hendrickson, A.E (1972): Electron microscopic distribution of axoplasmic transport. J. Comp. Neurol. 144:381-398.

Hery, F., Simonnet, G., Bourgoin, S., Soubrie, P., Artaud, F., Hamon, M and Glowinsky, J (1979): Effect of nerve activity on the in-vivo release of 3H-serotonin continuously formed from L-3H-Tryptophan in the caudate nucleus of the rat. Br. Res. 169:317-344.

Heslop, J.P (1975): Axonal flow and fast transport in nerves. Adv. Comp. Physiol. Biochem. 6:75-163.

Hesse, G.W., Hofstein, R and Shashoua, V.E (1984): Protein release from hippocampus in-vitro. Br. Res. 305:61-66.

Hyden, H. and Large, P.W (1970): S-100 brain protein: correlation with behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67:1959-1966.

Haydorn, W.E., Creed, J.G., Goldman, D., Kanter, D., Merrill, C.D and Jacobowitz, D.M (1983): Mapping and quantitation of protein from discrete nuclei and other areas of the rat brain by two-dimensional gel electrophoresis. J. Neurosci. 3(12):2597-2606.

Haydorn, W.E., Nguyen, K.G., Creed, G and Jacobowitz, D.M (1985): Effect of reduction cholinergic input on the concentration of specific proteins in different cortical regions of the rat brain. Br. Res. 289-213.

Hines, J.F and Easton, I (1970): Efflux of endogenous proteins from non-myelinated olfactory nerve as monitored by tryptophan fluorescence. J. Neurochem. 18:2195-2197.

Hines, J.F. and Garwood, M.M. (1977): Release of protein from axon during rapid axonal transport: An *in vitro* preparation. Br. Res. 125:141-148.

Hofstein, R., Hesse, G. and Shashoua, V.E. (1983): Protein of extracellular fluid of mouse brain: Extraction and partial characterization. J. Neurochem. 40(5):1448-1455.

Hokfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Terenius, L. and Stein, L. (1977): The distribution of enkephalin immunoreactive cell bodies in the rat central nervous system. Neurosci. Lett. 5:25-31.

Holtzmann, E. (1981): Membrane circulation: An overview. Math. Cell. Biol. 23:379-397.

Hong, J.S., Yang, H.Y.T., Racagni, G. and Costa, E. (1977): Projection of substance P - containing neurons from neostriatum to substantia nigra. Br. Res. 122:541-544.

Hortnagl, H., Hortnagl, H. and Winkler, H. (1969): Bovine splenic nerve: Characterization of noradrenaline-containing vesicles and other cell organelles by density gradient centrifugation. J. Physiol. (Lond) 205:109-114.

Hull, C.D., Levine, M.S., Buchwald, N.A., Heller, A. and Browning, R.A. (1979): The spontaneous firing pattern of forebrain neurons. The effects dopamine and non-dopamine depleting lesion on caudate unit firing patterns. Br. Res. 73:241-262.

Jessen, K.P., Chubb, J.N. and Smith, A.D. (1978). Intracellular localization of acetylcholinesterase in nerve terminals and capillaries of the rat cervical ganglion. J. Neurocytol. 7: 149-154.

Johnson, T.C. and Luttges, M.W. (1966): The effects of maturations on *in vitro* proteins synthesis by nerve cells. J. Neurochem. 13: 545-552.

Jouvet-Monnier, D., Astic, L. and Lacote, D. (1970). Autogenic of the states of sleep in cat, rat and genuine pig during the first postnatal months. Develop. Psychobiol. 2: 211-239.

Jouvet, M. (1969): Biogenic amines and states of sleep. Science 163: 32-41.

Kaczmarek, L.K. and Adey, W.R. (1975): Extracellular release of cerebral macromolecules during potassium - and low - calcium - induced seizures. Epilepsia 16: 41-47.

Kelly, P.T. and Luttges, M.W. (1976): Mouse brain protein composition during postnatal development: an electrophoretic analysis. J. of Neurochemistry 27: 1165-1172.

Kelly, P.T. and Cotman, C.W. (1977): Identification of glycoproteins and proteins at synapses in the central nervous system. J. Biol. Chem. 252(2): 786-793.

Kelly, R.B., Dutsch, J.W., Carlson, S.S. and Wagner, S.A.: Biochemistry of neurotransmitter release. Ann. Rev. Neurosci. 2: 399-446.

Kemp, S.N. and Powell, T.P.S. (1971): The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electromicroscopy. Phil. Trans. B. 262: 383-401.

Kiss, J. (1977): Synthesis and transport of newly formed proteins in dendrites of rat hippocampal pyramidal cells. An electron microscope autoradiographic study. Br. Res. 124: 237-250.

Kitahama, K. and Valatx, J.L. (1975): Effet du chloranphenicol et du thiamphenicol sur le sommeil de le souris. C.R. Soc. Biol. (Paris). 169: 1522-1525.

Kitai, S.T. (1981): Anatomy and physiology of the neostriatum. In: Di Chiara and Gessa eds. GABA and the Basal Ganglia. Raven Press, New York. pp. 1-21.

Klatzo, I. and Miquel, L. (1960): Observations on pinocytosis in nervous tissue. J. Neuropathol. Exptl. Neurol. 19: 475-487.

Kler, A. and Rosen, A. (1955): Differences in the pattern of soluble proteins from rat brain regions. J. of Neurochem. 4(5): 1033-1039.

Kobotake, K., Shimohara Y. and Yoshimura, S. (1980): Immunoglobulines in cerebrospinal fluid. J. Neurol. Sci. 47: 273-283.

Koenig, E. (1967): Synthetic mechanism in the axon. IV. In vitro incorporation of ³⁴S-precursors into axonal protein and RNA. J. Neurochem. 14: 437-446.

Koenig, E. (1985): Local synthesis of axonal protein. In: Monoblock of Neurochemistry, Second Edition 7: 315-339 Plenum Press, N.York and London.

Koenig, E. and Adams, P. (1982): Local protein synthesizing activity in axonal fields regenerating in vitro. J. of Neurochem. 34: 386-400.

Korner, A. (1965): Growth hormone control of biosynthesis of protein and ribonucleic acid. Recent. Prog. Horm. Res. 21: 205-238.

- Korr, I.M., Wilkinson, P.N. and Chernock, F.W. (1967): Axonal delivery of neuroplasmic components to muscle cells. Science **155**: 342-345.
- Kosik, K.S., Gilbert, J.M., Selkow, A.I. and Strocchi, P. (1982): Characterization of postmortem human brain proteins by two-dimensional by electrophoresis. J. Neurochem. **39**: 1524-1538.
- Kovacs, D.A., Zoll, J.G. and Srickson, C.K. (1976): Improved intracerebral chemitrode for chemical and electrical studies of the brain. Pharmacol. Biochem. Behav. **4**: 621-625.
- Kristensson K., Olsson, Y. and Sjostrand, J. (1971): Axonal uptake and retrograde transport of exogenous proteins in the hypoglossal nerve. Br. Res. **32**: 399-406.
- Kreutzberg, G.W. and Kaiya, H. (1974): Exogenous acetylcholinesterase as tracer for extracellular pathways in the brain. Histochemie, **42**: 233-237.
- Kreutzberg, G.W. and Toth, L. (1974): Dendritic secretion: a way for the neuron to communicate with the vasculature. Naturwissenschaften **61**: 37.
- Lajtha, A., Dunlop, D.S., Patilak, and Toth, S. (1979): Compartments of proteins metabolism in the developing brain. Biochem. Biophys. Acta **561**: 491-501.
- Lasek, R. J. (1970): Protein transport in neurons. Int. Rev. Neurobiol **13**: 289-324.
- Lasek, R. J., Gainer, H. and Przybylsky, L. J. (1974): Transfer of newly synthesized proteins from Schwann cells to the squid giant axon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **71**(4): 1188-1192.
- Lasek, R. J., Gainer, H. and Barker, J. L. (1977): Cell to cell transfer of glial proteins to the squid giant axon. J. Cell. Biol. **74**: 501-527.
- Lehman, J. and Fibiger, H. C. (1978): Acetylcholinesterase in the substantia nigra and caudate putamen of the rat: Properties and localization in dopaminergic neurons. J. Neurochem. **30**: 615-624.
- Link, H. E. and Olsson, J. E. (1972): Beta-trace proteins concentration in CSF in neurological disorders. Acta. Neurol. Scand. **48**: 57-68.
- Lichensteiner, W., Felix, B., Ehart, R. and Hefti, F. (1976): A quantitative correlation between single unit activity and fluorescence intensity of dopamine in zona compacta of the substantia nigra as demonstrated under influence of nicotine and physostigmine. Br. Res. **112**: 85-103.

Littauer U.Z., Giovanni, M.Y and Glick, M.C (1980): A glycoprotein from neurites of differentiated neuroblastoma cells. J. Biol. Chem. 255:5448-5453.

Lively, M.O and Walsh, K.A (1983): Hen oviduct signal peptidase is an integral membrane protein. J. Biol. Chem. 258:9488-9495.

Longo A.M (1978): Synthesis of nerve growth factor, in rat glioma cells. Develop. Biol. 65:260-270.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L and Randall, R.J (1951): Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Lucero, M.A (1970): Lengthening of REM sleep duration consecutive to learning in the rat. Br. Res. 35:565-569.

Lux, H.D., Schubert, P., Kreutzberg, G.W and Globus, A (1970): Excitation and axonal flow: autoradiographic study on motoneurons intracellularly injected with a 3H-aminoacid. Exper. Br. Res. 10:197-204.

Lynch, G., Smith, R.L., Browing, M.D and Beadwyler, S (1975): Evidence for bidirectional dendritic transport of horseradish peroxidase. pp:297-313. In: Kreutzberg, G.W. ed. Physiology and Pathology of Dendrites, Raven Press, New York.

Macarthur, C.G and Doisy, E.A (1918-9): Quantitative chemical changes in the human brain during growth. J. Comp. Neurol. 20:445-486.

Maira, G., Bareggi, S.R., Di Rocco, C., Calderini, G and Morselli, P.L (1975): Monoamine acids metabolites and cerebrospinal fluid dynamics in normal pressure hydrocephalus: results. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 38: 123.

Mans, R.J and Novelli, G.D (1960): Measurement of incorporation of radioactive aminoacids into proteins by a filter paper disk method. Archiv. Biochem. Biophys. 94:48-53.

Marks, M and Lajtha, A (1975): Protein and polypeptide breakdown. In: A. Lajtha (ed). Handbook of neurochemistry, pp:49-139, vol VA, Plenum Press, New York.

McEwen, B.S and Grafstein, B (1968): Fast and slow component of axonal transport of proteins. J. Cell. Biol. 38:494-508.

McGinty, D.J., Drucker-Colin, R.R and Bowersox, S.S (1982): Reticular formation unit discharge modulation by local perfusion in behaving cats. Exp. Neurol. 75:407-419.

Mercer, L., Del Fiocco, M and Cuello, A.C (1979): The smooth endoplasmic reticulum as a possible storage site for dendritic dopamine in substantia nigra neurons. Experientia. 35:101-103.

Merril, C.R., Switzer, R.C. and Vankeuren, M.L. (1979): Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4395-4399.

Michelot, r., Leviel, V., Torrrens, Y., Glowinski, J. and Cheramy, A (1979) : In vivo release of substance P in the cat substantia nigra. Neurosci Lett 15: 141-146

Moore, B.W. and Perez, V.J. (1966): Complement fixation for antigens on a picogram level. J. Immunology, 96: 1000-1004.

Moore, B.W. and McGregor, D. (1965): Chromatographic and electroforetic fractionation of soluble proteins of brain and liver. J. Biol. Chem 240: 1647.

Musick, J.R. (1979): Correlated release of acetylcholine and proteins from the neuromuscular junction. Am. J. Physiol 236: c255-C232.

Musick, J.R. and Hubbard, J.I. (1972): Release of protein from mouse motor nerve terminals. Nature 237: 279-281.

Nyers, R.D., Tytell, M., Kawa, A. and Rudy, T. (1971): Microinjection of 3H-acetylcholine, 14C-serotonin and 3H-norepinephrine into the hypothalamus of the rat: Diffusion into tissue and ventricles. Physiol and Behav 7: 749-751.

Narasimhachari, N. and Lin, R.L. (1975): Catechol-o-methyltransferase and indolethylamine-n-methyltransferase activity in CSF of dog, cat and human. Br. Res 87: 126-129.

Needle, J.H., Nadle, E.A. and Agranoff, B.W. (1972): Radioautography of the optic tectum of the goldfish after intraocular injection of 3H-proline. Science 176: 407-410.

Nieoullion, A., Cheramy, A. and Glowinsky, J. (1977): Interdependence of nigro - striatal dopaminergic system on the two sides of brain in cat. Science 198: 416-418.

Nirenberg, M. (1970): The flow of information from gene to protein. In: Aspects of proteins biosynthesis, pp: 219-241, ed, C.F. Afinsen Jr. Acad. Press N. York.

Ochs, S. and Hollingsworth, D. (1971): Dependence of fast axoplasmic transport in nerve of oxidative metabolism. J. Neurochem 18: 107-114.

O'Farrel, P.H. (1975): High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem: 4007-4021.

Ondo, J., Mansky, T. and Wutke, F. (1982): In vivo GABA release from the medial preoptic area of diestrous and ovariectomized rats. Exper. Br. Res 46: 69-72.

- Oswald, I (1969): Human brain proteins, drug and dreams. Nature 223:890-897.
- Palade, G (1975): Intracellular aspect of the process of protein synthesis. Science 189:347-358.
- Palay, S.L and Palade, G.E (1955): The fine structure of neurons. J. Biophysic. Biochem. Cytol. 1:69-88.
- Parker, D.C., Sassin, S.F., Mace, J.W., Gotlin, R.N and Rossman, L.G (1969): Human growth hormone release during sleep: electroencephalographic correlation. J. Clin. Endoc. Metab. 29(6):871-874.
- Patterson, P.H (1978): Environmental determination of autonomic neurotransmitter functions. Ann. Rev. Neurosci. 1:1-17.
- Pegram, V., Hammond, D and Bridges, W. (1973): The effects of protein synthesis inhibition in sleep in mice. Behav. Biol. 9:377-382.
- Pelletier, G., Labrie, F., Arimuro, A and Schally, A.V (1974): Electron microscopic immunohistochemical localization of growth hormone-release inhibiting hormone (somatostatin) in the rat median eminence. Am. J. Anat. 140:445-450.
- Perrachia, C (1981): Direct communication between axons and sheath glial cells in crayfish. Nature 290:597-598.
- Petitjean, F., Sastre, J.P., Bertrand, N., Cinty, C and Jouvet, M (1976): Suppression du sommeil paradoxal par le chloramphenicol chez le chat. Absence d'effet du thiamphenicol. C.R. Soc. Biol. (Paris) 169:1236-1239.
- Plattner, F and Hintner, A (1930): Die spaltung von acetylcholin durch organextrakte und Korperflussigkeiten. Pflugers Arch. ger. Physiol. 225:19-25.
- Potashner, S.I (1978): Effects of tetrodotoxin, calcium and magnesium on the release of aminoacids from slice of guinea-pig cerebral cortex. J. Neurochem 31:187-195.
- Pouzillout, J.J., Gaudin-Chazal, G and Ternaux, J.P (1977): A new device to study the release of neurotransmitter in alternating physiological conditions. Waking and Sleeping 1:423-424.
- Pouzillout, J.J., Gaudin-Chazal, G, Daszuta, A., Seyfritz, M and Ternaux, J.P (1979): Release of endogenous serotonin from "encephalé isolé" cats. J. Physiol. (Paris) 75:531-537.
- Quabbe, H.J., Schilling, E and Helge, H (1966): Pattern of growth hormone secretion during a 24 - fast in normal adults. J. Clin. Endocrinol. 26:1173-1178.

Raiteri, M., Bartollini, A., Angelini, F. and Levi, G. (1975): d - amphetamine as a releaser of reuptake inhibitor of biogenic amines in synaptosomes. Eur. J. Pharmac. 34:189-195.

Ramirez, G., Levitan, I. B. and Mushynski, W. E. (1972): Highly purified synaptosomal membranes from rat brain; incorporation of amino acids into membrane proteins in vitro. J. Biol. Chem. 247:5382-5390.

Rapoport, S. I. (1982): Neurobiology of Cerebrospinal Fluid 2. J. H. Wood (ed), Plenum Press, N. York.

Reith, M. E. A., Schotman, P. and Gispen, W. H. (1978): Measurements of in vivo rates of protein synthesis in brain, spinal cord, heart and liver of young versus hypophysectomized adult rats. J. Neurochem. 30:587-594.

Ritchie, T. C., Fabian, R. H. and Coulter, J. D. (1985): Axonal transport of antibodies to subcellular and protein fractions of rat brain. Br. Res. 343:252-261.

Rodeman, H. P., Napomn, L. and Goldberg, A. L. (1982): The stimulation of protein degradation in muscle by Ca^{++} is mediated by prostaglandin E2 and does not require the Ca^{++} activated release. J. Biol. Chem. 257:8716-8723.

Roffwarg, H. P., Muzio, J. N. and Dement, W. C. (1966): Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. Science 152:604-619.

Rojas-Ramirez, J. A., Aguilar-Jimenez, E., Rosada-Andrews, A., Bernal-Pedraza, J. and Brucker-Colin, R. (1972): The effects of various protein synthesis inhibitors on the sleep-wake cycle of rats. Psychopharmacology 53:147-150.

Rosenberg, R. N., Ivy, N., Kirkpatrick, J., Bay, C., Nyhan, W. L. and Baskin, F. (1981): Joseph Disease and Huntington Disease: Protein patterns in fibroblasts and brain. Neurology 31:1003-1014.

Rosenberg, R. N., Thomas, L., Baskin, F., Kirkpatrick, J., Bay, C. and Nyhan (1979): Joseph Disease: Protein pattern in fibroblasts and brain. Neurology 29:917-926.

Rothman, J. E. (1981): The golgi apparatus: Two organelles in Tauden. Science 213:1212-1219.

Sabatini, D. D., Kreibich, G., Marinoto, T., Adesnik, M. (1982): Mechanisms for the incorporation of protein in membranes and organelles. J. Cell. Biol. 82: 1-22.

Salton, S. R. J., Margolis, R. G. and Margolis, R. K. (1983): Release of chromaffin granule by glycoproteins and proteoglycans from potassium-stimulated PC-12 pheochromocytoma cells. J. Neurochem. 41: 1165-1170.

Sandberg, M., Lamberger, A., Karlsson, S.D. and Tirillini, B. (1980a): Potassium-stimulated release of axonally transported radioactivity from slices of rabbit superior colliculus. Br. Res. 188: 175-183.

Sandberg, M., Hamberger, A., Jacobson, I. and Karlsson, J.O. (1980b): Role of calcium ions in the formation and release of low molecular-weight substances from optic nerve terminals. Neurochem. Res. 5(11): 1185-1198.

Sarne, Y., Meale, E.A. and Gairer, H. (1976a): Protein metabolism in transected peripheral nerves of the cory fish. Br. Res. 110: 73-89.

Sarne, Y., Schrier, B.K. and Gainer, H. (1976b): Evidence for the local synthesis of a transmitter enzyme (glutamic acid decarboxylase) in crayfish peripheral nerve. Br. Res. 110: 91-97.

Sassin, J. (1977): Sleep related hormones. In: Neurobiology of sleep and memory, ed. R.R. Drucker-Colin and J.L. McGough, pp. 199-202. Academic Press, N.Y.

Schubert, D. (1973): Protein secretion by clonal glial and neuronal cell lines. Br. Res. 56: 387-391.

Schubert, D. (1976): Protein secreted by clonal cell lines: changes in metabolism with culture growth. Exp. Cell. Res. 102: 329-340.

Schubert, D. (1978): NGF induced alteration in protein secretion and substrate attached material of a clonal nerve cell line. Br. Res. 155: 196-201.

Schubert, D., Kreutzberg, G.W. and Lux, H.D. (1972): Neuroplasmic transport in dendrites: effect of colchicine on morphology and physiology of motoneurons in the cat. Br. Res. 47: 331-343.

Schubert, P. and Kreutzberg, G.W. (1975a): Dendritic and axonal transport of nucleoside derivatives in single motoneurons and release from dendrites. Brain Res. 90: 319-323.

Schulze, H.E. and Heremans, J.F. (1966): Molecular biology of human proteins, Vol. I, Elsevier, Amsterdam, pp. 732-761.

Shashoua, V.E. (1984): The role of extracellular glycoproteins in CNS plasticity: calcium effects on polymerization. Soc. Neurosci. 10: 195.12.

Shashoua, V.E., Hesse, G.W. and Moore, B.W. (1984): Proteins of the brain extracellular fluid: Evidence for release of S-100 protein. J. Neurochem. 42: 1536-1541.

Shashoua, V.E. (1985): The role of brain extracellular proteins in neuroplasticity and learning. Cell and Molec. Neurobiol. 5(1/2): 183-207.

Shashoua, V.E. and Holmquist, A.F. (1986): Extracellular fluid proteins of goldfish brain: Evidence for the presence of proteases and esterases. J. Neurochem. 47(3): 738-743.

Sherwin, A.L., Norris, J.W. and Burck, J.A (1969): Spinal fluid protein kinase in neurologic disease. Neurology 19:993-999.

Showell, H.L., Naccache, P.H., Shaafi, D.I. and Becker, E.L (1977): Effect of extracellular K^+ , Na^+ and Ca^{++} on lysosomes enzyme secretion from polymorphonucleus leucocytes. J. Immunol 119:804-811.

Silver, A (1974): The biology of cholinesterases. ed. North Holland. Amsterdam.

Skau, K.A and Brimijoin, S (1978): Release of acetylcholinesterase from rat hemidiaphragm preparations stimulated through the phrenic nerve. Nature 275:224-226.

Small, d.h., Ismael, Z. and Chubb, I.W (1986): Acetylcholinesterase hydrolyses chromogranin A to yield low molecular weight peptides. Neuroscience 19(1):289-295.

Smith, A.D., Depotter, W.P., Moerman, E.J. and De Schaepestryver, A.F (1970): Release of dopamine B hydroxylase and chromogranin A upon stimulation of the splenic nerve. tissue and Cell 2:547-568.

Snider, R.J and Niemer, W.F (1970): A stereotaxic atlas of the cat brain.: The University of Chicago Press.

Somogyi, P and Smith, A.D (1970): Projection of neostriatal spiny neurons to the substantia nigra. Application of combined Golgi-staining and horseradish peroxidase transport procedure at both light and electron microscopic levels. Br. Res. 178:3-15.

Sotelo, C and Palay, S.L (1971): Altered axon and axon terminals in the lateral vestibular nucleus of the rat. Possible example of axonal remodeling. Lab. Invest. 25:653-671.

Spech, S.C and Grafein, B (1977): Axonal transport and transneuronal transfer in mouse visual system following injection of 3H-fluorose into the eye. Exp. Neurol. 54:352-368.

Stadler, H., Lloyd, K.G., Gadea-Ciria, M and Bartholini, G (1973): Enhanced striatal acetylcholin release by chlorpromazine and its reversal by apomorphine. Br. Res. 55:476-480.

Stern, W.C., Morgane, P. J., Panksepp, J., Zolnick, A. J. and Jalowiec, J. E. (1972): Elevation of REM sleep following inhibition of protein synthesis. Br. Res. 47:253-258.

Stern, W.C., Jalowiec, J. E., Shabshelowitz, H. and Morgane, P. J. (1975): Effects of growth hormone on sleep-waking patterns in cats. Horm. Behav. 6:189-196.

Stern, W.C. and Morgane, P. J. (1977): Sleep and memory: Effects of growth hormone on sleep, brain biochemistry and behavior. In: Neurobiology of sleep and memory, ed. R. R. Drucker-Colin and J. L. McGough. pp:273-410. Academic-Press.

Straughan, D.W. (1960): The release of acetylcholine from mammalian motor nerve endings. Br. J. Pharmacol. 15:417-424.

Svensmark, O. (1961): Cholinesterases in human spinal fluid and brain. Acta. Physiol. Scand. 52:372-378.

Sweadner, K. J. (1981): Environmentally regulated expression of soluble extracellular proteins of sympathetic neurons. J. Biol. Chem. 256:4063-4070.

Sweadner, K. J. (1983a): Size, shape and solubility of a class of releasable cell surface proteins of sympathetic neurons. J. Neurosci. 3(12):2518-2524.

Sweadner, K. J. (1983b): Post-translational modifications and evoked release of two large surface proteins of sympathetic neurons. J. Neurosci. 3(12):2504-2517.

Szerb, J. C. (1961): Model experiments with Gaddum's push-pull cannulas. Canad. J. Physiol. Pharmacol. 49:613-620.

Takahashi, T., Kipnis, D. M. and Daughday, W. H. (1968): Growth hormone secretion during sleep. J. Clin. Invest. 47:2079-2090.

Tartakoff, A. and Vassall, P. (1978): Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. J. Cell. Biol. 79:694-707.

Tata, J. R. (1968): Hormonal regulation of growth and protein synthesis. Nature. 219:331-337.

Tedeschi, B., Wilson, D. L., Zimmerman, A. and Perry, G. W. (1981): An axonally transported protein released from sciatic nerve. Br. Res. 211:175-178.

Tobias, G. S. and Koening, E. (1975a): Axonal protein synthesized activity during U.S. early outgrowth period following neurotomy. Exp. Neurol. 49:221-234.

Tobias, G. S. and Koening, E. (1975b): Influence of nerve cell body and membrane cell on local protein synthesis following neurotomy. Exp. Neurol. 49:235-245.

Trading, R., Shelanski, M.L. and Morall, P. (1975): Glycoproteins released into the culture medium of differentiating murine neuroblastoma cells. J. Biol. Chem. **250**:9348-9354.

Tsuikita, S. and Ishikawa, H. (1980): The movement of membranes organelles in axons. Electron microscopic identification of anterogradely and retrogradely transported organelles. J. Cell. Biol. **84**:513-530.

Tytell, M. and Lasek, R.J. (1981): Properties of the glial protein complex transferred into the squid axon. Trans. Amer. Soc. Neurochem. **12**:95.

Tytell, M. and Lasek, R.J. (1984): Glial polypeptides transferred into the squid giant axon. Br. Res. **324**:223-232.

Ungerstedt, U., Forster, C., Herrera-Marshitz, M., Hoffman, I., Jungnellius, U., Tossman, U. and Zetterstrom, T. (1982): Brain dialysis. - A new in vivo technique for studying neurotransmitter release and metabolism. Neurosci. Lett. Suppl. **10**:493.

Uphouse, L.L., McInnes, J.W. and Schlesinger, K. (1974): Role of RNA and protein in memory storage: a review. Behav. Genet. **4**:29-31.

Viveros, G.H., Arqueros, L. and Kirshner, N. (1968): Release of catecholamines and dopamine- β -hydroxylase from the adrenal medulla. Life Sci. **7**:609-618.

Vigh, B. and Vigh-Teichman, I. (1973): Comparative ultrastructure of the cerebrospinal fluid-containing neurons. Int. Rev. Cytol. **35**:189-251.

Voronka, G.S., Demin, N.N. and Pezner, L.Z. (1971): Total protein content and quantity of basic proteins in neurons and neuroglia of the supraoptic and red nuclei of the rat brain in natural sleep and deprivation of rapid eye movement sleep. Dokl. Akad. Nauk. SSSR. **193**:974-977.

Walker, R.J., Ramp, J.A., Yazjima, H., Kitagawa, K., and Woodruff, G.N. (1976): The action of substance P on mesencephalic reticular and substantia nigra neurons of the rat. Experientia. **32**:214-215.

Wassef, M., Berod, A. and Sotelo, C. (1981): Dopaminergic dendrites in the pars reticulata of the rat substantia nigra and their striatal input. Combined immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and anterograde axonal transport. Neurosci. **6**:2124-2132.

Watt, D.E. and McIlwain, D.L. (1981): Distribution of soluble proteins within spinal motoneurons: A quantitative two dimensional electrophoretic analysis. J. Neurochem. **36**:242-250.

Weisner, B and Bernhardt (1973): Proteins fractions of lumbar, cisternal and ventricular cerebrospinal fluid. J. Neurol. Sci. 38: 205-214.

Weiss, P and Hiscoe, H (1948): Experiments on the mechanism of nerve growth. J. Expt. Zool 107: 315-395.

Weston, J and Greenfield, S.A (1986): Release of acetylcholinesterase in the nigrostriatal pathway: relation to receptor activation and firing rate. Neurosci 17(4): 1079-1088.

Wiesel, T.N., Hubel, D.H and Lam, D.H (1974): Autoradiographic demonstration of ocular dominance columns in the monkey striate cortex by means of transneuronal transport. Br. Res 78: 273-279.

Willard, H., Coan, W.W., Vagelos R.R (1974): The polypeptide composition of intraxonally transported proteins: Evidence for four transport velocities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 2183-2187.

Winkler, H and Smith, A.D (1975): The chromaffin granule and the storage of catecholamines. In: Handbook of Physiology, sec 7, vol VI, pp: 321-339, eds. H. Blaschko, G. Sayers and A.L. Smith.

Whittaker, V.P., Doleva, I.I., Dowe, G.H.C., Facino, R.W and Scott, A (1974): Problem of cholinergic synaptic vesicles from the electric organ of Torpedo: Characterization of a low molecular weight acidic protein. Br. Res. 75: 115-131.

Yang, H.Y., Hong, J.S and Costa, E (1977): Regional distribution of Leu and Met enkephalins in the rat brain. Neuropharmacology 16: 303-307.

Yaksh, T.L and Yamamura, H.I (1974): Factors affecting performance of the push-pull cannula in brain. J. Appl. Physiol 37: 429-434.

Yaksh, T.L., Felele, L.A and Yamamura, H.I (1973): Recovery of cholinesterase activity in the cerebrospinal fluid, brainstem and plasma of the unanesthetized cat after irreversible cholinesterase inhibition. Experientia 30: 38-39.

Yavin, E., Hana, I., Gil, S. and Guroff, G (1986): Nerve growth factor and gangliosides stimulated the release of glycoproteins from PC-12 pheochromocytoma cells. J. Neurochem 46: 894-898.

Young, R.W and Broz, B (1968): The renewal of protein in retinal rods and cones. J. Cell. Biol. 32: 163-184.

Youtkin, S.G., Brett, R.S., Gayey, B and Youtkin, L.H (1978): Substances moved by axonal transport and released by nerve stimulation have a innervation-like effect on muscle. Science 200: 1292-1295.

Zomzely-Neuroth, C and Keller, A (1977): Nervous system-specific proteins of vertebrates: a search for functions and physiological roles. Neurochem. Res. 2:353-377.