

TESIS CON
FALLAS DE ORIGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

WASKAR EGIDO VILLARREAL



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	5
I-REVISION HISTORICA	
A) ANTECEDENTES	
ANTIGUEDAD	6
EDAD MEDIA	11
RENACIMIENTO	12
SIGLOS XVII Y XVIII	13
SIGLO XIX	18
WALLER	20
RAMON Y CAJAL	21
REMAK	23
EPOCA MODERNA	23
B) ESTUDIOS SOBRE METABOLISMO NERVIOSO Y FLUJO AXONAL	26
C) ESTUDIOS ELECTROFISIOLOGICOS Y EL TRANSPORTE AXONAL	27
D) ESTUDIOS DE DEGENERACION Y REGENERACION, APLICACION DE LIGADURAS Y EL PROBLEMA DEL FLUJO AXONAL	27
II- FUNDAMENTOS	
A) MARCADORES RADIOACTIVOS	29
B) TRANSPORTE RETROGRADO	36
III- MATERIALES Y METODOS	
A) PROCEDIMIENTO GENERAL	40
B) APLICACION DE LIGADURAS PARA LOS EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE ENTRE LIGADURAS	41
IV- RESULTADOS	
A) EXPERIMENTOS CONTROL	45
B) GRAFICAS DE DISTRIBUCION DE MARCA RADIOACTIVA EN EL SEGMENTO ENTRE LIGADURAS	46

C) RESUMEN DEL CAMBIO DE NIVEL DE LOS FRAGMENTOS EXTREMOS PROXIMAL Y DISTAL RESPECTO AL TIEMPO	51
---	----

V- DISCUSION DE RESULTADOS

A) CANTIDAD DE MARCA TRANSPORTADA	53
B) VELOCIDAD DE TRANSPORTE RETROGRADO	58
C) REVERSIBILIDAD DEL TRANSPORTE	62
D) EL METODO	63

APENDICES

TABLA 1

TABLA 2

TABLA 3

TABLA 4

FIGURAS

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

En la actualidad se acepta que existe un transporte de proteínas y de otros componentes axonales desde el sitio de su elaboración, el soma neuronal, hacia las terminales nerviosas. Ochs, en su libro publicado en 1982(a) resume el conocimiento existente hasta esa fecha sobre transporte axoplásmico y caracteriza cinco tipos de transporte: rápido, intermedio, lento a, lento b -los cuales son anterógrados, del soma hacia las terminales- y retrógrado. Cada uno de éstos tiene una velocidad característica y se transporta preferentemente un tipo de material. El lento a transporta proteínas del grupo SCa que en su mayoría se conforma de tubulina, además de transportarse triplete de proteínas como las que conforman a los neurofilamentos. El lento b tiene una velocidad de 3 a 4 mm por día y a esta velocidad se transportan proteínas del grupo SCb, siendo la mayor proporción de éstas la actina. El intermedio es de 5 a 200 mm por día y así viajan, por ejemplo, fosfoproteínas y colesterol, además de enzimas como la acetil colinesterasa (AChE) y otras. El rápido tiene una velocidad máxima de 247 mm por día y en este grupo viajan principalmente componentes de la fracción particulada (Och, 1982 a y b). Además de Ochs, diversos autores coinciden en que el transporte axoplásmico rápido tiene una velocidad máxima de 16 a 18 mm/h (Ochs et al, 1969; Ochs, 1975; Ochs y Smith, 1975; Muñoz-Martínez et al, 1981; véase también la tabla 1).

Se sabe además que existe un movimiento retrógrado de material axonal que incluye proteínas recién sintetizadas (Ochs, 1982), pero a diferencia del caso del transporte

anterógrado, aún no hay acuerdo sobre cuál es la velocidad máxima de éste y cuáles las cantidades de material que regresan hacia el soma neuronal (véase la tabla 2).

En 1971, Kristensson et al. con la aplicación exógena de albúmina de bovino y peroxidasa de rábano a las ramas cerebrales y núcleo del nervio hipogloso de ratas y conejillos de indias, determinaron una velocidad de transporte retrógrado de 5 mm/h; Edström y Hanson, en 1973, utilizan nervio ciático de rana y aplican ^3H -leucina, con lo cual calculan una velocidad retrógrada de 2.5 mm/h y Frizell y Söstrand (1974) encuentran una velocidad de 2.5 mm/h mediante un método muy parecido. En 1975 Ochs utiliza el mismo método en forma similar y encuentra que la AChE se transporta a una velocidad de 9.6 mm/h. Bisby y Bulger en 1977 estimaron que la velocidad del transporte retrógrado sería de aproximadamente la mitad del transporte anterógrado y que regresa entre el 40 y el 50% del material marcado que alcanza el extremo distal, para el caso del nervio ciático de rata. Además, se han calculado diversas velocidades de transporte retrógrado y se han dado diversos estimados de las cantidades que regresan hacia el soma neuronal (véase la tabla 2).

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta tesis es tratar de definir cuál es la velocidad máxima del transporte retrógrado y cuáles las cantidades de proteínas recién sintetizadas que viajan en ambas direcciones en el interior del axón.

Se consideró interesante hacer una revisión histórica que permita tener una idea global del desarrollo de los conceptos sobre el transporte intraaxonal, lo que puede ser de algún valor para quienes deseen iniciar una investigación relacionada con el transporte axoplásmico o para quien requiera consultar la bibliografía básica a este respecto.

I REVISION HISTORICA

A) ANTECEDENTES

ANTIGUEDAD

Ochs (1982), se remonta a la antigua Grecia para iniciar la historia de las primeras ideas sobre la función de los nervios. Erasitrato y Galeno (310 a 250 y 130 a 201 a.c., respectivamente) imaginaron la existencia de un "fluido" que difundía en el interior de los nervios, los cuales se concebían como tubos huecos. Dicho fluido era el **pneuma** o "espíritus" que se extraían del aire en el acto de la respiración.

La teoría neumática fué tomando forma en la medicina griega a través de cientos de años. Al igual que otras teorías, es probable que la idea del **pneuma** se haya originado en culturas anteriores. En el libro publicado por Lain-Entralgo en 1972, Rivière discute las posibles relaciones entre las teorías médicas hindu y griega, así como la probable influencia iraníana y egipcia sobre la medicina de la antigua Grecia, y deja abierta la posibilidad de que, tanto la medicina hindú (Vedas) como la iraníana, hayan influido en los conceptos médicos griegos, ya que existían contactos culturales y comerciales entre el antiguo Egipto, Grecia y la India por mediación de los persas.

La idea de una relación entre enfermedades y humores que circulan en el cuerpo, y que se menciona en los papiros egipcios, es muy parecida a la teoría humoral elaborada por los griegos, la cual, en sus inicios fué presentada en forma aún más parecida a la concepción egipcia. También para los egipcios, la necesidad de respirar implicaba que en el aire existe algo que

vivifica y anima a todas las partes del cuerpo; este concepto puede relacionarse con el de **pneuma** desarrollado por los griegos (Laton, 1963). Por otra parte, se ha afirmado que en los escritos hipocráticos aparecen recetas que prácticamente son copias de prescripciones terapéuticas o farmacológicas del papiro Ebers (Farherus, 1954).

En cuanto a la relación entre la teoría neumática griega y los conceptos similares hindúes, es difícil establecer la primacía de una cultura sobre la otra, debido a la imposibilidad de fechar los escritos hindúes más antiguos, es decir, el origen de los Vedas, aunque es indudable que hay gran similitud entre los escritos griegos y los referentes al mismo tema elaborados por los hindúes; por ejemplo, existe un gran parecido entre la obra llamada "Sobre los vientos" acreditada a Hipócrates, y el "corpus" hindú en el que se habla del **prana** (aliento), (Riviere, 1972).

Otra posibilidad es que las teorías neumática hindú y griega, así como las teorías humorales, hayan tenido un desarrollo paralelo a partir de una base común que se habría dado en épocas más antiguas en una extensa área cultural; de ésta habrían tomado sus ideas ambas sociedades (Lain Entralgo, 1978). A fin de cuentas, la culminación de la elaboración de la teoría neumática llevó a los hindúes a conjugar ésta con la práctica del yoga y a los griegos a la formación de la escuela neumática, más desarrollada, a la que diversos grupos de pensadores griegos le dan diferentes giros. Algunos de ellos buscan sustentar la teoría neumática, o la hacen compatible, con elementos más concretos; se le asignan funciones a los pulmones, el corazón, el cerebro y los nervios, en el desarrollo y transformación corporal del **pneuma**.

Al seguir la pista del neumatismo encontramos que los griegos préfilósofos consideraban al neuma como la explicación racional de la vida y aceptaban que el alma estaba íntimamente relacionada con la respiración. Los filósofos naturales como Diógenes de Apolonia; sostenían que el pensamiento humano procedía del aire flotante que circulaba en la sangre (Barquin, 1971).

Aparece en el siglo V a.c. una figura griega de gran importancia para la anatomía y la fisiología humanas, Alcmeón de Crotona. Antes de la época en la que vivió este discípulo de Pitágoras, el hígado y el corazón habían sido considerados como los dos centros de mayor importancia para la vida animal y se hacía, de alguno de ellos, el centro de las sensaciones, de los sentimientos, del control de las funciones corporales e incluso, el sitio de residencia del alma. Alcmeón, al descubrir la existencia de los nervios ópticos, consideró que el centro de la vida intelectual y los sentidos no era el corazón sino el cerebro. Otra idea de este hombre fue la de tomar a los nervios como canales huecos y también, la de establecer que cada sensación tenía una zona de localización en el cerebro (Poynter, 1957). Alcmeón llegó a estas conclusiones basado en sus estudios de anatomía en animales y humanos y mediante especulaciones filosóficas utilizando un método de inferencia analógica (Lasso de la Vega, 1972).

Es importante hacer notar que fueron los griegos los primeros en hacer disecciones, por lo común en animales y esporádicamente en cadáveres humanos, para estudiar la anatomía de los órganos internos e iniciar el estudio de la fisiología del cuerpo desde el punto de vista de la fisiología moderna. En los escritos conocidos como "hipocráticos", algunos atribuidos a Hipócrates (460 a

375 a.c.); se resume el conocimiento médico de la época. Al revisar los conceptos de **pneuma** (soplo) de Hipócrates, reconocemos la similitud con la idea hindú sobre el **prana**, pero también sus diferencias. El **prana** fué para los hindúes el "soplo" o "hálito" multiforme que en el Rigveda, en términos generales significa aliento, vida, viento nacido en el hombre visto éste como ser cósmico. Estos soplos se van modificando y diversificando en los sucesivos escritos védicos hasta constituirse en una elaborada teoría neumática, pero nunca se le relaciona con los órganos ni se le asigna ubicación física a estos soplos (Lain-Entralgo, 1972). El **pneuma** hipocrático tendría cuatro funciones principales en el organismo: alimentar, impulsar, refrigerar (templar el "calor implantado") y vivificar. Según los escritos hipocráticos el **pneuma** llegaría, primero al encéfalo después de entrar por la boca, la nariz y la piel. La mayor parte iría al cerebro para producir la inteligencia y también, a los pulmones, al corazón, al vientre, para refrescarlo y a las distintas partes del cuerpo mediante las venas. (Lain-Entralgo, 1972).

Los filósofos griegos, por ejemplo Platón y Aristóteles: 428 a 348 y 384 a 322 a.c., respectivamente, cultivaron ideas muy parecidas a las de Hipócrates, Alcmeón y a las de los médicos sicilianos, aunque los diversos filósofos les imprimieron sus puntos de vista particulares de acuerdo a la teoría filosófica que les era propia a cada uno de ellos (Lasso de la Vega, 1972).

Después de esta época, Herófilo (335 a 280 a.c.) hizo importantes estudios anatómicos del cerebro y los nervios; distinguió entre nervios sensitivos y nervios motores (Barquin, 1971).

Para Erasistrato (310 a 250 a.c.) el **pneuma**

era introducido a los pulmones desde el aire circundante en el acto de la respiración; pasaba al corazón donde era transformado en espíritu vital y de ahí, una parte pasaba al cerebro donde era transformado en "pneuma psychikón". Este pneuma era, a su vez, transmitido a todo el cuerpo mediante los nervios para que se pudieran realizar funciones como la contracción muscular (Wilson, 1959).

La culminación de la teoría neumática se aprecia en la obra de Galeno (201 a 130 a.c.). Él hizo una extensa elaboración de esta teoría apoyado en estudios hechos en animales. Para Galeno, como para otros griegos anteriores a él, el pneuma era extraído del aire circundante en el acto de la respiración.

Clásicamente aparecen tres tipos de pneuma en los trabajos del médico griego: el pneuma psychikón (espíritu animal) cuyo asiento estaría en el cerebro (centro de la sensación y el movimiento), el pneuma zotikón (espíritu vital) el cual se mezclaría con la sangre en el corazón -la sangre arterial transportaría este espíritu a partir del corazón (centro de la nutrición y el metabolismo)- y el pneuma physikón (espíritu natural) que llegaría a la sangre desde el hígado (centro de la nutrición y otras funciones básicas del cuerpo) (Castaglioni, 1941).

Los espíritus animales se moverían desde el cerebro hacia todo el cuerpo mediante los nervios que serían estructuras huecas por donde fluirían estos espíritus.

Por otra parte, Galeno realizó un gran número de excelentes estudios anatómicos y fisiológicos en diversos órganos incluyendo al cerebro, la médula espinal y los nervios periféricos.

Esta teoría neumática, con diversas modificaciones, tuvo validez durante varios siglos y no fué sino hasta

la aparición de los estudios anatomofisiológicos de hombres como Vesalio y Harvey, unos 1,400 años después, cuando apenas se comenzó a dudar de la teoría galénica de los espíritus.

EDAD MEDIA

El rompimiento producido en la Edad Media, entre una época esclavista y la nueva época feudal no pudo, en un principio, superar las ideas tradicionales de la antigüedad en el campo médico. Así, los hombres del medievo se vieron obligados a retomar los conceptos existentes sobre humores y neuma para explicar las enfermedades y fisiología humanas. Por ejemplo, Macrobius (500 d.c.) y Santa Hildegarda (1098 a 1180) tomaron estas antiguas ideas de los griegos para explicar, el primero, cómo el alma que residiría en el cerebro, actúa en el cuerpo mediante los espíritus (Poynter, 1957) y la segunda, para adecuar la teoría de los humores y poder explicar las enfermedades y la fisiología general humanas (Singer, 1955).

El estancamiento e incluso retroceso de la medicina de la Edad Media, se debió en gran medida a la imposibilidad de hacer estudios en cuerpos humanos y al férreo control e inmovilismo al que la Iglesia y los hombres poderosos del medievo sometieron, no sólo a la Medicina, sino a todos los campos del conocimiento. Las Cruzadas (1195 a 1291) jugaron un papel importante en la reapertura de los diferentes campos del conocimiento, incluido el médico, ya que fué entonces cuando se formaron las universidades y los hospitales donde se atendía a los heridos que resultaban de las batallas, de manera que los médicos podían realizar observaciones en heridos y en soldados muertos.

La base sobre la cual arrancaron las nuevas investigaciones fué la de los escritos griegos.

RENACIMIENTO

Hasta el Renacimiento se pudo iniciar la superación de la tradición griega, particularmente la galenista. Aunque la base seguía siendo el galenismo, empezó a dudarse de ideas que, finalmente, resultaron equivocadas. Esta nueva etapa la iniciaron estudiosos como Michael Servetus (1511 a 1553) y Realdo Colombo (1510 a ?) al estudiar la circulación sanguínea (Castaglicioni, 1941), pero el exponente más representativo de esta situación es Andrés Vesalio (1514 a 1564). Su trabajo en anatomía, *De humanis corpori fabrica*, es impresionante y el mejor de su época (O'Malley, 1972).

Es de hacerse notar que para entonces, el estudio en cadáveres humanos era una práctica común, por lo que la anatomía pudo avanzar rápidamente. Aunque Vesalio se basaba en los escritos galénicos, se permitía dudar de ellos e incluso pudo superar ideas falsas hasta entonces reconocidas como incontrovertibles. Por ejemplo, estableció que los nervios no eran huecos, ya que en sus estudios no había encontrado ninguna oquedad y negó la existencia de la famosa "rete mirabile" (fina red de arterias de la base del cerebro) en los humanos al darse cuenta de que ésta sólo existe en los ungulados. La *rete mirabile* se suponía que era el sitio donde se producía el espíritu animal, fuente de toda sensación y movimiento (O'Malley, 1972).

SIGLOS XVII Y XVIII

William Harvey (1578 a 1657), como el primer exponente del estudio moderno de la circulación sanguínea, luchó en contra de la teoría de los humores. Para él y desde entonces, el corazón es visto como una bomba sin otra atribución especial más que la propia que hoy le reconocemos. Harvey desechó la idea de que había aire en las arterias y planteó un modelo del sistema circulatorio. Pero lo importante es que la teoría del **pneuma** y de los espíritus tuvo que buscarse otro asiento diferente al corazón y otra vía de transmisión que no las venas y arterias (Lain-Entralgo, 1972).

En adelante se produce una sucesión de teorías que tratan de colocar a los "espíritus" e "influidos" en diferentes órganos y de adjudicarle diferentes vías y modos de acción. La tendencia más difundida fue la de elaborar teorías que trataban de explicar el funcionamiento de los nervios con base en cada nuevo descubrimiento que se hacía. De esta manera, toda teoría o hallazgo en el campo de la mecánica, la óptica, la química, etc., que por su importancia impresionaban al mundo científico, era fuente de nuevas especulaciones explicativas de la fisiología de los espíritus o influjo nervioso.

Es por eso entonces que René Descartes (1596-1650) elabora una compleja teoría del supuesto modo de acción de los espíritus animales, elabora un modelo totalmente mecanicista mediante el cual explica cómo la función nerviosa sería semejante al funcionamiento de un órgano de iglesia, encuentra similitud entre pedales, llaves, tubos, organista, etc. y diferentes partes del sistema nervioso (Foynter, 1957). Descartes vuelve a hablar de los antiguos espíritus animales, los cuales, como diminutos corpúsculos,

permitían el juego fisiológico de una estimulación sensitiva con la consiguiente respuesta muscular. La glándula pineal, sitio del alma, sería una superficie reflejante y los nervios estarían constituidos como tubos huecos llenos de líquido, un jugo nervioso cuya penetración en los músculos determinaba la contracción (Cid, 1978).

Para Silvio (1614 a 1672), los nervios eran conductores de los "espíritus animales" que se generaban en el cerebro mediante una especie de destilación a partir de la sangre arterial (Lain-Entraigo, 1978). Borelli (1618 a 1679) propone un fluido nervioso de consistencia líquida parecida al "espíritu del vino" (*succus nerveus*) que sería el acarreador del impulso nervioso, el cual sería transmitido por medio de un movimiento mecánico de tipo hidráulico; también cree que los nervios son huecos (Poynter, 1957).

Para Willis (1621 a 1675), la causa de la contracción muscular es una "bóveda elástica", reacción química producida al encontrarse en el interior de las fibras musculares las partículas integrantes de la sangre y de los "espíritus animales" que llegan por los nervios. La reacción se desencadenaría por una oleada súbita de "espíritus animales" enviada por decisión previa a cada movimiento voluntario (López-Riñero, 1972). Según Willis los "espíritus animales" serían de la misma naturaleza que el vino o el amoníaco. El impulso viajaría en una columna fluida y los nervios serían como ductos esponjosos inflados por el espíritu animal, lo cual produciría su vibración (Poynter, 1957).

Desde el punto de vista de Marcelo Malpighio (1628 a 1694), las fibras de los nervios serían canales llenos de líquido; el fluido nervioso, el cual habría sido excretado en la

sustancia cortical, por la glándula cortical que él suponía que existía. El impulso nervioso se transmitiría a través de una masa líquida mediante un impulso mecánico siguiendo el principio conocido como de Pascal (Lain-Entraigo, 1978).

Con la aparición del microscopio óptico se dotó a las ciencias biológicas de una poderosa herramienta. En particular, Antonio Van Leeuwenhoek (1632 a 1723), al observar mediante sus propios microscopios preparaciones de nervios seccionados, encontró que se producía un exudado en el extremo de cada uno de los canales circulares que forman los paquetes nerviosos (Ochs, 1982). Este autor encontró cavidades en nervios de vaca, pero no pudo lograrlo en el caso del nervio óptico (Poynter, 1957).

Es interesante saber lo que Isaac Newton (1642 a 1727) escribió en relación a la fisiología nerviosa. En la parte final de su trabajo sobre gravitación, publicado en 1713, acepta la existencia de espíritus más sutiles que los estudiados por él, los cuales operan como "espíritus eléctricos y elásticos" que producen su efecto mediante su vibración y que viajan por los "filamentos sólidos de los nervios" (Poynter, 1957).

Para Giorgio Baglivi (1668 a 1703), la naturaleza de los espíritus nerveos es comparable la del "éter" de Newton y los elementos de las fibras nerviosas poseen elasticidad como propiedad fundamental (Busacchi, 1972).

Alexander Stuart (1677 a 1742), hizo observaciones en ranas decapitadas que hoy catalogaríamos como estudios sobre los "reflejos". Cuando presionaba sobre la médula, las patas traseras de la rana comenzaban a agitarse. Stuart se explicaba

ello como resultado de un desplazamiento del fluido nervioso desde la médula hacia las extremidades ocasionado por la presión (Lain-Entraigo, 1972). Esto lo realizó Stuart 40 años antes de que se conocieran los trabajos de Galvani sobre el mismo tema.

Stephen Halles (1677 a 1781), afirmaba que había una propiedad eléctrica que actuaba en la superficie de las fibras nerviosas, aunque no explicó más (Brazier, 1959).

La teoría de **Nicholas Robinson** de 1729, dice que existen "maquinulas" o pequeños corpúsculos de material que modifican su movimiento y distancia en cada contracción de una fibra. Los nervios tendrían propiedades elásticas (Poynter, 1957).

Boerhaave (1688 a 1738), rechazó la teoría de los nervios elásticos ya que veía que éstos eran suaves, pulposos y flácidos, por lo que no podrían tensarse, condición necesaria para que las fibras pudiesen actuar elásticamente mediante contracción y relajación. Por esto, consideró más pertinente la existencia de un jugo nervioso que se formaría en el cerebro y que sería "el más sutil y móvil de los humores del cuerpo", con lo que revivió las viejas teorías de los espíritus y humores (Poynter, 1957).

Albert von Haller (1708 a 1777), pionero en el estudio de la irritabilidad, consideró probable que los nervios estuviesen constituidos como finos tubos llenos de una sustancia especialmente fluida, de una índole tan original como la luz, como el magnetismo, como el éter; sin embargo, su opinión es cauta y no llega a afirmarlo (Fahreus, 1954).

Ya para ese entonces comenzaban a diferenciarse los campos de estudio de la fisiología y muchas ideas de la neurofisiología que hasta entonces eran confusas, cada vez se

volvían más claras. Así, la histología y en particular la neurohistología, hacían grandes avances y en la electrofisiología comenzaban los estudios de los iniciadores.

Fontana Felice (1730 a 1805) realizó algunas de las primeras observaciones importantes en histología del sistema nervioso; describió lo que en ese entonces llamó cilindroeje y la vaina de mielina (Cid, 1978). Decía Fontana que la electricidad era un buen candidato para ser el principio que permitiría la contracción muscular (Poynter, 1957).

Para la época en que Luigi Galvani (1737 a 1798) hacía sus experimentos, ya se habían dado importantes descubrimientos relacionados con el campo de la "electricidad animal". Sobre esto, Albarracín Teulón y Gracia-Gillén (1972) comentan lo siguiente: "la invención de la botella de Leyden y las máquinas electrostáticas permitió observar el efecto motor de las descargas eléctricas y todo el París culto quedó conmovido cuando el abate **Nollet**, en 1749, hizo saltar ante Luis XV a toda una compañía de guardias; antes de 1733, **Stephen Hales**, había pensado que el rozamiento entre los hematies produce electricidad; Hausen en 1743, Carl Gottlob Kessler en 1714 y Sauvages en 1753, llegaron a una idea común sobre la identidad entre el "fluido eléctrico" y el "fluido nervioso"; Jaalabert, por su parte, en 1749, creyó haber provocado un aumento del calor orgánico mediante la "electrización" y tanto él como Caldani, Haller, Laghi y Fontana lograron obtener contracciones musculares mediante la estimulación eléctrica. Por otra parte, y en de esta misma época Lain-Entraigo (1972) comenta que: "numerosos investigadores (Hunter, Walsh, Ingenhousz, Cavendish) demostraron la

indole eléctrica de la sacudida que produce el contacto con determinados peces, como el gimnoto y el torpedo patiniforme; tanto el abate Bertholon en 1780, como Bonnefoy en 1782, llegaron a afirmar la existencia de una "electricidad animal", como correctamente dice Rothschild, el Nervensaft (succus nerveus) ya se había convertido en Nervenkraft (vis nervea: "fuerza nerviosa") cuando Galvani estaba iniciando sus decisivos experimentos". En todo caso, Galvani concebía a las fibras nerviosas como tubos llenos de líquido que conducían los espíritus o fluido nervioso, el cual sería de naturaleza eléctrica (Ochs, 1982).

SIGLO XIX

Los investigadores del siglo XIX hablaban de propiedades materiales, concretas de los nervios, por lo que habría manera de poner a prueba las diferentes afirmaciones. J.C. Reil (1783 a 1817) afirma que cada nervio tiene su propia energía e independencia. La estructura fundamental sería la fibra nerviosa y ésta sería un tipo de cristalización de la materia; toda fibra tendría tres cualidades: excitabilidad (erregbarkeit), irritabilidad (reizbarkeit) y sensibilidad (empfindlichkeit). El cerebro se veía como una especie de pila voltaica (Foynter, 1957).

Purkinje (1787 a 1869), concebía al nervio como un canal, no como un lumen que conduce un fluido, sino como un centro estructurado en la fibra nerviosa. Este canal consistiría de una "estructura orgánica depositada" o "alguna sustancia particular de tipo proteínico (Hydén, 1967). Con ayuda de sus dibujos, actualmente reconocemos que tal estructura es el axón.

Había por entonces quienes, apoyados en los nuevos descubrimientos eléctricos, consideraban que los nervios conducían fuerzas de tipo eléctrico, como si éstos fueran cables. Otros, sin embargo, como **Johanes Müller** (1801 a 1858) consideraban que la fuerza nerviosa no era conducida de esta manera; este investigador encontró que la conducción nerviosa no estaba asociada a corrientes eléctricas que pudiesen detectarse por los galvanómetros entonces disponibles y de manera más importante, demostró que una ligadura que detiene la transmisión nerviosa aun permite que el nervio húmedo conduzca electricidad (Poynter, 1957).

Para **Roberto Remak** (1815 a 1885), las fibras eran sólidas y muy finas (Hydén, 1967).

En la segunda mitad del siglo XIX hubo un gran avance en el campo de la histología, particularmente del sistema nervioso. Los trabajos iniciales fueron hechos por autores como Ehrenberg, Schwann, Valentin, Purkinje, Remak y Racini, de los cuales ya mencionamos algunos. Köne, en 1878, estudia las terminaciones nerviosas, **Betz**, en 1874, las células piramidales, Ranvier en 1876, la morfología de las vainas tendinosas (Cuéllar, 1972).

Surge entonces, una intensa discusión entre los defensores de la teoría neuronal y los que apoyan la teoría reticular **Otto F. Deiters** define la constitución básica de la célula nerviosa con sus expansiones protoplásmicas (que después His llamaría dendritas) y su cilindroeje. Köliker, en 1841, apoyaba en sus escritos a la teoría neuronal. Otros que apoyaban dicha teoría, en contra de la teoría reticular, eran His y Forel (Papp, 1972).

Waldeyer, en 1891, resume los conocimientos acumulados hasta entonces sobre ganglios y fibras nerviosas; además,

apoya la hipótesis neuronal con base en los estudios del desarrollo embrionario de dichas estructuras realizados por His en 1886 (Parker, 1929). Entre los primeros estudios sobre las neurofibrillas también son importantes los trabajos de Kölliker de 1944 en fibrillas "meduladas" de vertebrados (Parker, 1929 a y b).

WALLER

Por otra parte, los estudios realizados mediante sección de nervios periféricos y observando la degeneración del segmento distal, probaron que las fibras nerviosas dependen de los cuerpos neuronales para su sobrevivencia, lo cual constituyó un avance importante en relación al estudio del transporte axoplásmico. Sobre esto Ranvier en 1871 dice que Nasse en 1849 fué el primero en señalar la degeneración de la porción periférica de un nervio seccionado caracterizada por la segmentación de la mielina y que "...Waller más tarde en 1852, retoma la misma cuestión con el propósito de utilizar esta degeneración para resolver experimentalmente la trama de los nervios y para determinar el origen de los nervios periféricos".

Los estudios de **Waller** son importantes ya que es él uno de los primeros en proponer una relación metabólica (trófica) entre los ganglios (cuerpos neuronales) y las fibras nerviosas. Sobre esto Waller en 1852 dice: "La explicación de los hechos precedentes (degeneración del segmento distal a la sección nerviosa, pérdida de la excitabilidad del mismo e influencia de la temperatura en estos fenómenos), parece ser la siguiente: el cuerpo del animal, como todo fisiólogo lo admite, se compone de partes que se destruyen y renuevan sin cesar. Aunque no tenemos la posibilidad de

asegurarnos directamente de este hecho, esto es resultado del equilibrio que existe entre estas dos acciones contrarias. Mientras subsista la influencia del ganglio sobre la fibra, se mantendrá este equilibrio; pero tan pronto como se destruye la conexión del corpúsculo ganglionar con la fibra, su extremo periférico queda en los tejidos como un cuerpo extraño, sobre el cual se ejercen sólo las fuerzas destructivas que lo eliminarán mas o menos rápidamente..." (ver Ochs, 1982).

RAMON Y CAJAL

Ramón y Cajal, en una de sus extensas y excelentes obras (1909), resume claramente la situación del estudio de los nervios en la época posterior a Waller y en el tiempo en que las técnicas de tinción para microscopia óptica comienzan a proliferar. Ramón y Cajal está convencido de que, en primer lugar, la hipótesis neuronal es cierta y en segundo lugar, que las fibras nerviosas dependen de los cuerpos neuronales para su subsistencia y dice que Waller no fué el primero en utilizar el método de sección y degeneración ya que "...antes de él y desde 1850, Turk, había observado que las lesiones de la médula producen alteraciones sistemáticas de la sustancia blanca..." (Ramón y Cajal, 1909). Aún así, le atribuye a Waller el haber desarrollado ampliamente este método. En otra parte de su obra escrita en 1909 Ramón y Cajal describe el desarrollo efectuado en el estudio del funcionamiento y anatomía nerviosos, a partir de la utilización del método de Waller, por diferentes investigadores tales como Gudden, Mayser y otros, en experimentos con diferentes animales y bajo diversas condiciones experimentales.

Sobre los estudios de Waller, Ramón y Cajal dice que las conclusiones de éste son las siguientes: "...el centro trófico de las raíces anteriores o motoras se encuentra en la médula, en su parte anterior, en tanto que el de las raíces posteriores o sensitivas quedan en los ganglios espinales, dicho de otra manera, todo tubo nervioso separado de su centro trófico degenera...", y continúa diciendo, "...Nosotros, más dichosos que Waller, sabemos hoy en día lo que es exactamente ese centro trófico; y decimos: todo tubo nervioso separado de su célula de origen, se desorganiza y muere; sólo la parte aún conectada a esta célula conserva su vitalidad y tal vez también sus funciones conductoras..." y más adelante, "...En la célula pues, ya sea nerviosa u otra, donde los apéndices sean protoplásmicos, cilindroaxiales o de otro tipo, el centro trófico, el principio director de los intercambios nutritivos, la fuente de vida, es el núcleo y tal vez, para precisar más, osaremos insinuar: es la cromatina del núcleo...". Es de hacerse notar que los resultados de las observaciones del eminente histólogo español implicaban ya desde entonces (1909) y de una manera que podría llamarse profética, que la síntesis proteínica se encuentra restringida casi totalmente al soma neuronal y por lo tanto, es necesario el transporte intraaxoplásmico de dichas proteínas hacia las regiones distantes del soma; de ésta manera se explicaría la dependencia de las prolongaciones nerviosas con su "centro trófico". Ramón y Cajal sabe que en el núcleo se producen sustancias esenciales para el mantenimiento de la vida de los axones aunque, no es posible para él descubrir qué sustancia o sustancias son, sólo sabe que son sustancias tróficas.

REMAK

Ya en 1838 Remak había observado con claridad las neurofibrillas axonales, además de haber sido también uno de los primeros en mencionar la continuidad entre el axón y el soma neuronales (Parker, 1929 a y b). El mismo Remak no hace ninguna especulación respecto a la función de tales fibrillas. Posteriormente, Ramón y Cajal les atribuye, al igual que otros autores, un papel de conductores de los estímulos nerviosos y así nos dice: "estas neurofibrillas, que son los conductores únicos de las excitaciones nerviosas, forman fascículos en las dendritas y el cilindroeje..." (Ramón y Cajal, 1909). El mismo autor dice también que la sustancia o las sustancias tróficas probablemente difundan por el neuroplasma situado entre las fibrillas.

EPOCA MODERNA

Después de las observaciones de Remak, una serie de investigadores trabajaron en la identificación y caracterización morfológica de tales fibrillas hasta el punto de que no existía ya duda sobre su existencia (Ramón y Cajal, 1909). Pero no fue sino hasta 1929, 90 años después de efectuados los estudios de Remak, cuando Parker formula la hipótesis metabólica de las neurofibrillas según la cual, dichas estructuras estarían "involucradas específicamente en la distribución de las influencias metabólicas y no en la conducción del impulso nervioso..." (Parker, 1929 a y b). Y declara también, que tales influencias partirían desde la región del núcleo. Parker llega a esta conclusión después de analizar el curso que siguen las neurofibrillas y darse cuenta de que éste es diferente

al de los estímulos nerviosos. Toma en cuenta los estudios de la ontogenia de las neurofibrillas, además de que por aquel entonces se estaba ya aclarando la manera en que se produce el impulso nervioso y el papel de la membrana axonal en la transmisión de tal impulso (Parker, 1929 a).

En esta época se inician una serie de estudios sobre metabolismo nervioso y por otra parte está en proceso el estudio de la transmisión del impulso nervioso de una manera más formal y profunda. Entre los investigadores que estudiaron el metabolismo nervioso encontramos al mismo Parker (1929a) y a Gerard (Cook y Gerard, 1931; Gerard, 1932). En su mayoría, estos investigadores tendían a explicar el metabolismo nervioso con base en estudios sobre la producción de CO_2 (en nervios *in vivo* o *in vitro*), el consumo de O_2 o la producción de calor; esto con base en las experiencias que había en cuanto al estudio del metabolismo muscular. Pero encuentran grandes dificultades para medir el consumo de energía y su relación con los procesos metabólicos, ya que la actividad metabólica, medida conforme al consumo de energía, es infinitamente menor a la de un músculo y los cálculos de intercambio gaseoso o producción de calor se hacen en el límite del margen de error, que marcan los aparatos utilizados para medir cambios energéticos con estos parámetros (Parker, 1929a). Aunque el inicio de los estudios sobre metabolismo nervioso no se sitúan en esta época, ya que existen trabajos sobre este tema de mayor antigüedad (por ejemplo, consultar a Ranvier, 1871), si es en ese entonces que se pretende hacer un estudio integral sobre este tema contando, además, con nuevos avances técnicos (Parker, 1929a, 1932; Gerard, 1923).

Ya en esta época se puede percibir claramente una división del estudio del funcionamiento de los nervios en tres campos principales; uno sería el de sus propiedades electrofisiológicas, otro el de los procesos de degeneración y regeneración nerviosa y el último el del metabolismo nervioso. No existe una separación real de los tres campos de estudio y en la práctica generalmente se hacen estudios combinados; lo que hace la diferencia es la finalidad de cada uno de éstos. En las investigaciones que se hacen en cada una de estas áreas, en muchos casos está presente, en las consideraciones del autor, el problema que nos ocupa, es decir, el del transporte axoplásmico. Por ejemplo, los estudios de Weiss y Hiscoe (1948) prueban la movilidad y consistencia líquida del axoplasma mediante la aplicación de diferentes tipos de ligaduras y la observación al microscopio de los axones en el segmento distal y proximal a la ligadura.

El estudio del funcionamiento nervioso mediante degeneración y regeneración, es de los métodos más antiguos ya que desde antes de Waller (1852) era utilizado en alguna medida por diferentes investigadores. Ciertamente esta técnica llegó a ser muy utilizada con la introducción de nuevas variantes. Esto lo demuestra la serie de trabajos hechos por Young (1942, 1944), Weiss y Hiscoe (1948 y resumidos por Barondes en 1967) e incluso el trabajo de Parker en este campo (1932).

B) ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO NERVIOSO Y EL FLUJO AXONAL

En el área del estudio del metabolismo nervioso, también se realizaron una gran cantidad de investigaciones. El resumen de dichos estudios lo hizo Gerard en 1932. En esta obra se

hace énfasis en las diferencias metabólicas entre los nervios estimulados y no estimulados. El trabajo de Gerard ofrece una visión general sobre el estudio del metabolismo nervioso en los años 30. Por otra parte, aporta también una serie de argumentos, con bases bioquímicas, que fortalecen la posibilidad de que salga a la luz un fenómeno del tipo de flujo axonal. Gerard habla de proponer un flujo axonal (transporte de sustancias químicas o de cambios físicos) para explicar la dependencia del axón con su cuerpo celular.

Otro resumen es el de Hydén (1943), en el cual se da una amplia visión sobre la utilización de técnicas histoquímicas, precisamente para detectar la producción de proteínas y de nucleótidos. Hydén hace comparaciones entre el contenido de proteínas y de nucleótidos en células normales no estimuladas y en células excitadas o células cuyo axón había sido seccionado. Hydén encontró diferencias entre los tres grupos, las cuales dependían del intervalo entre el momento en que se hace el estudio y la realización de la maniobra experimental. El extenso estudio de este autor se encuentra dirigido a definir que el cuerpo celular de la neurona es el centro que dirige la producción de proteínas y de ácidos nucleicos, mediante microtécnicas de análisis bioquímicos, principalmente la espectrofotometría.

El estudio del metabolismo nervioso es el que ha estado más correlacionado con los estudios de transporte axonal (Abbott, 1973) y muchos de los estudios de transporte axonal continúan estando ligados a los estudios de metabolismo nervioso (Grafstein, 1977; Grafstein y Forman, 1980; Ochs, 1971, 1975; Ochs et al., 1967).

C) ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS Y EL TRANSPORTE AXONAL

Los primeros estudios modernos de electrofisiología, (consultar a Brazier, 1959), contribuyeron ampliamente a aclarar la cuestión del transporte axonal. Una vez establecido el mecanismo de transmisión del impulso eléctrico, por Bernstein en 1868 (Brazier y Parker, 1929a y b) y ya aclarado que este fenómeno se da principalmente a nivel de la membrana axonal, es posible proponer un papel trófico (conductor de "influencias" metabólicas) para las neurofibrillas (Parker, 1929), idea que perdura hasta la actualidad, con la diferencia de que hoy sabemos de manera más cierta que éstas transportan material (principalmente proteínas y lípidos) para el mantenimiento de la forma y función axonales, aunque esto sólo se proponga como parte de la hipótesis para explicar el mecanismo de transporte mediante modelos (Grafistein, 1980; Ochs, 1971, 1982b y 1971).

D) ESTUDIOS DE DEGENERACIÓN Y REGENERACIÓN, APLICACIÓN DE LIGADURAS Y EL PROBLEMA DEL FLUJO AXONAL

Después de aparecidos los trabajos de Parker hay cierto retorno al estudio del transporte axonal por medio de las técnicas de degeneración y regeneración y mediante la aplicación de constricciones a nervios periféricos (Young, 1942 y 1944).

Es en esta época cuando aparecen estudios sobre el transporte axoplásmico por medio de enfoques más específicos, principalmente por medio de aminoácidos radiactivos (proteínas), neurotransmisores y enzimas específicas (Waelisch, 1958; Hebb, 1957; Von Euler, 1958; Hebb, 1956; Friede, 1959). Por otra parte, se hacen

estudios de microfilmación de organelos en cultivo de tejidos (Nakai, 1956) y de manera más importante se comienzan a usar marcadores radiactivos. Es de hacerse notar que desde entonces y hasta la fecha, métodos como el corte de nervios, la aplicación de ligaduras y la degeneración y regeneración nerviosas, son ampliamente utilizados por muchos investigadores en sus estudios de transporte axoplásmico y otros temas como por ejemplo la identificación de vías neuronales del sistema nervioso central.

II FUNDAMENTOS

En la sección anterior se esbozó la historia general de los orígenes y evolución del concepto del transporte axoplásmico. En este capítulo se dan los elementos que sirven para enmarcar el tema particular de esta tesis, es decir, se proporcionan los elementos de la historia reciente que atañen directamente al tema central.

Se dedica una sección a los marcadores radiactivos ya que ha sido mediante estas técnicas como más y con mayor rapidez se ha avanzado en el estudio del transporte axoplásmico y porque aquí se ha utilizado ^3H -leucina.

A) MARCADORES RADIACTIVOS

Entre los primeros trabajos en los que se utilizaron marcadores radiactivos para estudiar la fisiología de los seres vivos se encuentran los del húngaro George Hevesy.

En 1923, Hevesy publica un trabajo sobre absorción y distribución de plomo radiactivo en plantas cultivadas en

soluciones que contenían plomo marcado. Entre los resultados de aquel trabajo se encuentran los relacionados con la toxicidad del plomo en la planta estudiada.

En 1934 el mismo Hevesy, junto con Hofer, reportan estudios hechos en ellos mismos como sujetos experimentales, acerca de la eliminación de agua, para lo cual tomaron agua que contenía tritio. Lewis, en 1934, utiliza agua tritiada para hacer estudios de toxicidad en diferentes organismos vegetales y animales.

Es Chewitz el que propiamente inicia el uso de marcadores radiactivos en el estudio de la fisiología animal, y en 1935 publica con Hevesy un trabajo en el que describen el metabolismo del fósforo, es decir, la distribución de este elemento en diferentes órganos a partir de la aplicación, por vía oral, de fosfato de sodio (con P^{32}). Hevesy encuentra un nivel muy bajo de fósforo en el cerebro y la médula, en comparación con el resto de los tejidos examinados.

Aparecen por entonces varios trabajos sobre el metabolismo del fósforo en diferentes órganos (Cook et al., 1939; Artom et al., 1937; Dols y Jansen, 1937; Hahn et al., 1937), de fosfolípidos (Perlman et al., 1937; Artom y Sarzana, 1937; Artom et al., 1937; Hevesy y Lundsgaard, 1937; Fries, 1938; Enteman et al., 1938; Changus et al., 1938; Artom y Sarzana, 1938) y sobre diversos fenómenos fisiológicos, v.gr. la medición del volumen sanguíneo (Hahan y Hevesy, 1940).

En algunos de estos trabajos se estudian elementos del sistema nervioso central y periférico. Por ejemplo, Cook et al. (1937) estudian diferentes órganos, entre ellos al cerebro; lo mismo hacen Artom et al. (1937), Hahan et al. (1937), Changus et al. (1938) y Artom y Sarzana (1938).

En la mayoría de estos estudios la vía de aplicación del marcador es oral (Chiewitz y Hevesy, 1935; Cook et al., 1937; Hevesy y Lundsgaard, 1937; Changus et al., 1938; Anton y Sarzana, 1937; Hahan et al., 1937; Enteman et al., 1938).

Para entonces ya había suficientes evidencias de los dos hechos siguientes: el axón depende del cuerpo neuronal para su funcionamiento y para su sobrevivencia y se afirma entonces que existen algunas sustancias que se transportan desde el soma hacia las terminales y que mantienen la integridad del axón y de las terminales (Gerard, 1932 y Young, 1944a). Además, ya se comenzaba a especular sobre la velocidad a la que se movería el axoplasma, velocidad que en un principio se calculaba en base a la velocidad de la regeneración axonal (3 a 4 mm/día, Young, 1942).

Entre los primeros estudios realizados directamente sobre la fisiología de los nervios mediante el uso de marcadores radiactivos, se encuentran los de Weiss quien en 1944 utilizó colorantes y marcadores tales como $^{24}\text{NaCl}$, $^{64}\text{CuCl}_2$ y $^{64}\text{CuSO}_4$, para estudiar el flujo de sustancias en los espacios endoneurales. Estos marcadores se colocaban directamente sobre los nervios ciático y braquiales de ratas albinas y conejillos de indias, *in situ* o *in vitro*.

El mismo Weiss, en 1948, publica un importante trabajo. La idea fundamental de este trabajo consiste en que el axoplasma crece continuamente y así se repone el material gastado en el metabolismo inherente al axón. En sus propias palabras él explica lo siguiente: "El crecimiento perpetuo de la neurona supuestamente sirve para reemplazar sistemas protoplásmicos

catabolizados, especialmente proteínas, las cuales no pueden sintetizarse en el citoplasma periférico". Nótese la referencia particular a las proteínas y la afirmación de que éstas no pueden sintetizarse en el axoplasma, afirmaciones que actualmente sabemos son ciertas y sustentan el concepto de transporte axoplásmico. Weiss utiliza términos que en mayor o menor grado siguen siendo de uso común cuando se trata del fenómeno de transporte axoplásmico, como por ejemplo, conexión axoplásmica, frente de avance de la onda de flujo (actualmente frente de onda), o conceptos como el de que "la fuerza necesaria para el aparato matriz (del transporte) es casi seguramente derivada de procesos metabólicos locales". Por ser este un trabajo de gran importancia en cuanto al desarrollo del estudio del transporte axoplásmico remitimos al lector a la fuente original (consultar la referencia 117).

Otro estudio pionero es el de Causey y Werner (1950) en el que aplican fosfato de sodio mediante inyección intravenosa. Utilizan el nervio sural (sensitivo) y el nervio gastrocnemio (muscular) del conejo. Para saber si se producen cambios en la distribución de fósforo en estos nervios, al hacer la comparación entre células estimuladas y no estimuladas a diferentes tiempos, en algunos casos aplican estímulos al nervio sural y permiten el movimiento del animal, y en otros mantienen al conejo en reposo (caso con los nervios gastrocnemios), extraen los nervios, los dividen en un segmento proximal, otro medio un tercero distal, y miden el contenido de P^{32} en los tres segmentos. En el caso del nervio sural los autores encuentran que la actividad produjo un aumento en la concentración proximal del isótopo y en el caso del nervio gastrocnemio el aumento se dió en el fragmento distal.

En esta tesis se utilizó leucina tritiada como marcador de las proteínas que, después de haberse sintetizado en el soma neuronal, se transportan a lo largo del axón (Ochs 1967, 1968 y 1970). Como antecedentes del uso de aminoácidos marcados para el estudio de la fisiología nerviosa encontramos el trabajo de Friedberg et al, quienes en 1948 utilizaron metionina marcada con ^{32}P . Friedberg estudia el recambio de aminoácidos en diferentes órganos incluido al cerebro, en el cual encuentra una tasa baja de recambio; cuando el aminoácido se inyectaba directamente en el SNC (en la cisterna magna) se evitaba la barrera hematoencefálica y las proteínas del cerebro incorporaban más aminoácidos que otros órganos.

De aquí en adelante se presentan los antecedentes de los estudios actuales sobre transporte axoplásmico.

Gerard, en un trabajo editado por Weiss en 1950 y que no presenta gráficas ni tablas de datos, afirma haber encontrado una corriente de alta actividad específica en la fracción fosfoproteínica: Gerard experimentó con ^{32}P aplicado intraperitonealmente a conejillos de indias por espacio de una a dos semanas y determinó la actividad específica (^{32}P) de cuatro fracciones (fósforo soluble, fosfolipina, nucleoproteínas y fosfoproteínas) en cerebro, médula espinal y dos o tres segmentos del nervio ciático y encuentra que la incorporación del fósforo radiactivo es relativamente lenta. Lo importante es que, aunque no presenta los datos, encuentra un movimiento distal de nucleoproteínas marcadas. Todos sus datos se reducen a tres cocientes de actividad: durante los primeros 10 días posteriores a la aplicación del marcador, la relación del segmento proximal respecto al distal es de 1.4 a 1.0, durante los siguientes 10

días la relación es de 1.1 a 1.0 y en los últimos 10 días es de 0.7 a 1.0. La velocidad que calcula para este avance es aproximadamente de 3.5 mm/día, la cual compara con la velocidad encontrada por Weiss y que actualmente sabemos se aproxima a la velocidad del transporte axoplásmico lento y que se atribuye al transporte mediante el cual se reponen materiales constitutivos de la célula como los neurofilamentos y los microtúbulos. Los mismos resultados pero con tablas y gráficas, se publican en 1961 por Samuels et al. (incluido Gerard).

Gaitonde, en 1956, utiliza ^{35}S -metionina para estudiar la velocidad de recambio de proteínas. Aplica el marcador por vía intracisternal y subaracnoidea para evitar la barrera hematoencefálica. Lotfield (1956) utiliza ^{14}C -valina, ^{14}C -isoleucina y ^{14}C -leucina, también para estudiar recambio de proteínas, aunque aplica el marcador por vía intravenosa.

El estudio del transporte axoplásmico se había centrado en el tipo de transporte que tiene una velocidad característica de 1 mm/día, pero ya para entonces comenzaron a aparecer indicios de que existían velocidades mayores a ésta. **Koenig** (1958), al aplicar ^{35}S -metionina y ^{14}C -glicina por vía intratecal, encuentra una velocidad de 4 a 5 mm/día y también de 2 a 11 mm/día, en nervio ciático de gato, pero desafortunadamente no presenta gráficas ni tablas. **Sachs**, en 1960 concluye que la vasopresina se transporta proximodistalmente a una velocidad mucho mayor a 1 mm/día.

Mientras tanto se comienza a usar otro tipo de marcadores y se aplican otras técnicas para probar que existe el transporte axoplásmico y para estudiar sus características (véase la tabla 1).

La mayoría de estos trabajos utilizan

marcadores o analizan la acumulación de neurotransmisores o enzimas en una constricción. En 1963 Miani, por una parte y Lubińska y por otra concluyen que debe existir una velocidad de transporte mucho mayor de 1 a 2 mm/día. Para hacer tal afirmación Miani se basa en la velocidad de recambio de proteínas y Lubińska en la velocidad de acumulación de la AChE ante una constricción. Ambos fenómenos no se pueden explicar mediante las velocidades de transporte hasta entonces encontradas.

Burdwood (1965), con base en sus estudios de cinematografía concluye que la velocidad de transporte axoplásmico debe ser mayor a las encontradas anteriormente y Lasek (1966), mediante el uso de ^3H -leucina propone dos velocidades, una de 1 a 2 mm/día y otra unas 100 veces mayor, aunque no da la cifra exacta. Hemos de decir aquí que el método de Lasek es muy parecido al que se utiliza en el presente estudio.

Dahlström y Häggendal (1966) miden niveles de monoaminas, catecolaminas y 5-hidroxitriptamina, en el nervio ciático de ratas y gatos y calculan la velocidad de flujo con base en la acumulación de dichas sustancias en una ligadura. Así, concluyen que la velocidad de transporte es de 5 a 6 mm/h (120 a 144 mm/día) en rata y de 9 a 10 mm/h (216 a 240 mm/día) en gato.

Grafstein (1967) registra una pronta aparición de gránulos marcados con leucina tritiada en el tectum óptico de la carpa dorada y como una posible explicación, propone una rápida velocidad de transporte. Weiss (1967) menciona la posibilidad de que las proteínas marcadas con ^3H -leucina se transporten rápidamente mediante canales líquidos en el axón y Lasek (1968) utilizando también leucina tritiada y el nervio ciático del gato y por medio de

autorradiografía, encuentra una velocidad de 20.8 mm/h, aunque sus resultados no son claros ya que de sus datos se deduce una velocidad de 17.85 mm/h a partir de sus datos. Es entonces que diferentes autores encuentran una velocidad de alrededor de 17 mm/h, pero la demostración clara la hacen Ochs et al en 1969 al mostrar la onda de avance de las proteínas marcadas. A partir de entonces se definen otras características del transporte axoplásmico tales como el tipo de material transportado, la dependencia de la velocidad del transporte de la temperatura, las sustancias que inhiben el transporte, etc. (consultar a Ochs, 1980).

B) TRANSPORTE RETROGRADO

En 1956 Nakai logra ver vesículas fagocíticas que se mueven no sólo en dirección proximodistal, sino también en dirección distoproximal en el interior de axones de neuronas en cultivo. Él considera que este hecho hace necesario que se revisen los conceptos entonces existentes en los que únicamente se habla de transporte proximodistal, excluyendo la idea, que por entonces tenía gran credibilidad, de que el axoplasma o sus componentes se mueven en su totalidad hacia la periferia.

Los primeros trabajos sobre transporte retrógrado estuvieron relacionados con los estudios del transporte anterógrado. En un principio se estudió la acumulación de enzimas en ambos lados de ligaduras aplicadas a nervios (Clouet, 1961; Lubińska, 1963 y 1964; Lubińska y Niemierko, 1971) y también, desde entonces, mediante la acumulación de marcadores radiactivos en la vecindad de éstas (Miani, 1963).

Lubińska (1964) por primera vez llama la atención acerca de la existencia del transporte retrógrado y afirma que la AChE se acumula distalmente a una constricción nerviosa. Otro de los pioneros del estudio del transporte retrógrado fue Lasek (1966 y 1967) quien registra la acumulación de proteínas marcadas con ^3H -leucina distalmente a una constricción y da una explicación de la posible función que tendría este transporte de sustancias desde las terminales hasta el soma neuronal. Lasek dice lo siguiente: "El flujo bidireccional en los axones debe ser un mecanismo para llevar información bioquímica desde el cuerpo celular hacia los axones y de regreso hacia el cuerpo celular. Así, el movimiento axoplásmico bidireccional podría representar un circuito de retroalimentación, mediante el cual el cuerpo celular de la neurona efectúa el seguimiento del perfil bioquímico de su larga prolongación citoplásmica" (Lasek, 1970).

Es preciso señalar que la mayoría de los estudios de transporte axonal retrógrado se han hecho mediante el método de aplicación de ligaduras (Lubińska, 1963; Miani, 1964; Lasek, 1966 y 1967; Dahlström et al, 1966; Bray et al, 1971; Edström et al, 1973; Ochs, 1975; Sjöstrand y Frizell, 1975; Bisby, 1977 y Bisby y Bulger, 1977), aunque también se han hecho estudios de microscopía sobre el movimiento de vesículas (Nakai, 1956; Pomerat et al, 1967; Burdwood, 1965) o estudios mediante la aplicación periférica de marcadores exógenos como es el caso de la peroxidasa de rábano y la albúmina de bovino (Kristensson et al, 1971).

En cuanto a la velocidad del transporte retrógrado, no existe consenso sobre cuál es la máxima o si existen diferentes velocidades, como en el caso de la velocidad del transporte

anterógrado (véase la tabla 2). El caso de las cantidades del material transportado retrógradamente se encuentra en situación parecida. Se ha dicho que regresa el 10% de lo transportado anterógradamente (Edström, 1973), el 16% de lo que hay entre dos ligaduras (Frizell y Sjöstrand, 1974a), el 20% de lo que llega al extremo distal (en 16 h en el nervio vago de conejo; Sjöstrand, 1975), el 50% de lo que viaja anterógradamente (en el lapso de 21 h; Lubińska, 1971; Sjöstrand y Frizell, 1975 en el caso del nervio hipogloso en un lapso de 16h), el 70% (en 24 h; Bray et al., 1971, con base en sus gráficas) y aún se dan otras cifras (véase la tabla 2). En donde sí existe coincidencia total es en que siempre regresa menos material del que viaja en dirección anterógrada.

Bisby, en 1977, publica dos trabajos, uno de ellos junto con Bulger el cual es un estudio amplio sobre la velocidad y cantidades de proteínas que caracterizan al transporte retrógrado. En resumen, el procedimiento que sigue este autor es el siguiente: inyecta ^3H -leucina en el 5° ganglio lumbar o en la zona del asta ventral de la médula espinal de la rata; en ese momento o seis horas más tarde, en algunos casos aplica una ligadura distal, a lo que llama lesión (acumulación entre ligaduras) y en otros no (acumulación desde terminales). Después, a tiempos que van de 1 a 24 h, aplica dos ligaduras "colectoras" proximales a la ligadura distal. Finalmente da un periodo de dos o tres horas (periodo colector) antes de sacrificar al animal. Posteriormente, calcula la tasa de acumulación de marca con base en el promedio de la cantidad de marca que hay en los fragmentos de tres milímetros que se encuentran a los lados de los fragmentos de colección y compara ese promedio con la cantidad de marca que encuentra en estos fragmentos a diferentes intervalos (véase la figura

1). Para calcular la velocidad del transporte retrógrado divide la distancia que hay entre la ligadura colectora distal y la ligadura distal, entre el tiempo en el que se alcanza la máxima acumulación proximal. Las velocidades que encuentra son: 133 mm/día para axones sensitivos y 112 mm/día para axones motores. Además calcula que se requieren 0.8 horas para que se inicie el transporte retrógrado, es decir, que hay una latencia desde que llega la marca al extremo distal e invierte su dirección. Para calcular el total de radiactividad movida por el transporte retrógrado, integró las curvas obtenidas para las velocidades de acumulación retrógrada y anterógrada.

Bisby concluye que regresa un máximo de entre 40 y 44% del total de proteínas que llegan al extremo distal (Bisby y Bulger, 1977).

Actualmente se aceptan como válidos los resultados obtenidos por este autor (Ochs, 1982a).

Para estudiar cuál es la velocidad máxima del transporte retrógrado y tener una idea de cuáles son las cantidades de proteínas que viajan en ambos sentidos en el interior del axón se utilizó los siguientes:

III MATERIALES Y METODOS

A) PROCEDIMIENTO GENERAL

El método utilizado es esencialmente el mismo que describe Ochs (1972a y c) y que utilizan Muñoz-Martinez, Nuñez y Sanderson en su trabajo publicado en 1981.

Se trabajó con gatos adultos de ambos sexos con peso de entre 1,800 y 3,000 kg, los cuales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (anestesal, 35 mg/kg de peso). Una vez anestesiados se les practicó laminectomía lumbar para dejar al descubierto la médula espinal desde el 4° ganglio lumbar (G1-4), hasta el sacro.

Se preparó ^3H -leucina (New England Nuclear) liofilizada y disuelta en solución de Hartman, a una concentración de 5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$. Esta solución se inyectó mediante micropipetas de vidrio cuya punta tenía un diámetro aproximado de 50 micras. Las inyecciones aplicaron mediante presión de aire; se conectó la micropipeta a una jeringa a través de un tubo de polietileno y se inyectó con ayuda de un microscopio de disección (véase la figura 2).

En algunos experimentos se inyectó en el G1-7 y la médula a nivel de las raíces dorsales contralaterales, en otros, a nivel de ambas zonas de raíces dorsales y, aún en otros, se inyectaron ambos ganglios L-7.

En todos los casos se introdujo la micropipeta en posición vertical aproximadamente 1.5 mm y en la médula se introdujo hasta alcanzar la zona del asta ventral (3.5 mm aproximadamente, a partir del dorso de la médula).

Cuando se hizo inyección en ganglio se aplicó una sola dosis de 10 μ l para cada ganglio (50 μ Ci entotal) y en el caso de la inyección en la médula se hicieron cuatro aplicaciones de 10 μ l en cada una a lo largo del séptimo segmento lumbar (200 μ Ci en total) a través de pequeñas incisiones en la dura madre y con una distancia aproximada de 2 a 3 mm entre una y otra.

B) APLICACION DE LIGADURAS PARA LOS EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE ENTRE LIGADURAS

En todos los experimentos se utilizaron ambos nervios ciáticos. A cada nervio ciático se le aplicaron dos dobles ligaduras (hilo quirúrgico 2/0): una proximal, colocada lo más cerca posible de la salida del nervio ciático de la fosa iliaca y la distal a 3.5 cm de la primera. En medio de ambas dobles ligaduras se seccionó el nervio ciático para asegurar la interrupción de los nervios. En los casos de experimentos control, se hizo esta maniobra en uno de los nervios ciáticos y en el contralateral sólo se aplicó la ligadura proximal. En los demás casos se aplicaron las dos dobles ligaduras sobre ambos nervios ciáticos. En general, las ligaduras se aplicaron ocho horas después de la inyección en los ganglios (véase la figura 3). Enseguida de haber hecho las ligaduras, se aplicó un pedazo de algodón empapado en solución de Hartman (previamente calentada a 38°C) sobre el nervio ciático y se cerró la herida con grapas quirúrgicas.

Desde ese momento y hasta cuando se sacrificó al animal, se mantuvo la temperatura rectal del animal lo más cerca posible a 38°C mediante el uso de una o dos lámparas de 100 vatios.

A partir de aplicadas las ligaduras se dejaron pasar tiempos que van de 0.5 a 15 horas, después de lo cual se procedió a extraer los segmentos de nervio ciático comprendidos entre las dos dobles ligaduras. En el momento de abrir la herida se extrajeron el algodón y el segmento de nervio ciático y éste se bañó con solución de Hartman la cual previamente se había enfriado colocándola en una bandeja con hielo picado.

Los segmentos de nervio ciático se limpiaron hasta donde fué posible de tejido conectivo, se mantuvieron fríos con baños continuos de solución de Hartman a 10°C aproximadamente. Una vez limpios, los segmentos de nervio se seccionaron en fragmentos de 5 mm cada uno utilizando navajas quirúrgicas de un solo filo. Cada fragmento de nervio se colocó en un frasco de vidrio (vial) para proceder a su digestión alcalina, para lo cual se agregaron 500 µl de la solución comercial NCS (Amsterdam Corp.) y se dejaron los viales en el horno por espacio de 3 a 4 h a una temperatura de entre 50 y 60°C. Enseguida se procedió a dejar enfriar los viales hasta alcanzar la temperatura ambiente, después de lo cual se agregaron 10 ml de solución centelleante (POPOP, 100 mg y PPO 4 gr disueltos en tolueno; reactivos Packard). Las muestras se mantuvieron por un periodo mínimo de 24 h en cuarto frío (4°C) para proceder entonces a cuantificar el contenido de radiactividad (CPM) en cada uno de los viales, por medio del método de conteo por centelleo líquido (dos minutos en contador Packard-Tricarb 2425). Se determinó la radiactividad de fondo mediante blancos conteniendo lo mismo que las muestras experimentales excepto

³H-leucina. Las cuentas de fondo fueron en promedio de 80 CPM; dicha cifra se restó a los valores experimentales obtenidos.

Finalmente, la cantidad de cuentas obtenidas se graficaron en papel semilogaritmico. En estas gráficas, el eje de las X corresponde a la distancia en cm, en sentido proximodistal y el eje de las Y a la radiactividad (cuentas por minuto; CPM). En el eje de las X, el 0 corresponde al sitio de inyección.

Para los resultados de los experimentos de transporte entre ligaduras se hizo la normalización de los mismos de la siguiente manera: el total de CPM del segmento entre ligaduras se tomó como 100% y con base en éste se calculó el porcentaje que representa cada uno de los segmentos de 5 mm entre ligaduras respecto al total. Esto se expresa en la sencilla fórmula siguiente:

$$\%cpm \text{ de } c/5mm = (cpm \text{ de ese fragmento} / CPM \text{ de todos los fragmentos}) 100$$

Cada punto de las figuras (o cada barra) representa el promedio de por lo menos cuatro experimentos.

Nota: Para facilitar el estudio de las figuras, los segmentos se designaron como A el primero (de 0.0 a 0.5 cm), B el segundo (de 0.5 a 1.0 cm) y así sucesivamente hasta el más distal que es el G (de 3.0 a 3.5 cm).

Como el segmento de nervio ciático con el que trabajamos en el momento de aplicar las ligaduras presenta un perfil casi horizontal (véase la figura 2, que es de un experimento control), se estableció que a las 8 h de haber inyectado el GI-7, la cantidad de marca de cada uno de los fragmentos de 5 mm es igual a la cantidad de cualquiera de los otros fragmentos, es decir, que del

total de marca del segmento entre ligaduras a cada fragmento de 5 mm (que son siete en total), le corresponde aproximadamente un 14.28%. Esto se representó en las figuras mediante una línea punteada (figuras de resultados 5 a 15).

En estas figuras también se señala la cantidad de marca que ha quedado retenida en cada fragmento de 5 mm, es decir, la fracción que ha quedado inmóvil. Para calcular estas cantidades se hizo lo siguiente: de acuerdo al trabajo de Muñoz-Martínez et al. de 1981, del total de proteínas que pasan por cada fragmento axonal de 5 mm de largo se retiene el 1.5%.

De nuestros experimentos control conocemos la cantidad de marca que hay por delante de cada fragmento de 5 mm en el segmento entre ligaduras. Con el método siguiente calculamos la cantidad de marca, respecto al 14.28% que hay en cada fragmento de 5 mm, que ha quedado retenida en cada uno de ellos:

$$(Pd) (1.5) / 100 = Tr; (100) (Tr) / Pf = Cr; (14.28) (Cr) / 100 = \%r$$

donde:

Pd = proteínas distales = total de CPM distales al fragmento de 5 mm

Tr = total de proteínas retenidas = total de CPM retenidas en el fragmento

Pf = proteínas del fragmento = CPM de cada uno de los fragmentos de 5 mm

Cr = cantidad retenida relativamente = % de proteínas retenidas relativamente

$\%r$ = porcentaje retenido = % de CPM retenidas en el fragmento respecto al 14.28 % original

Los valores obtenidos se presentan en la tabla 3.

IV RESULTADOS

Para asegurarnos de que la técnica utilizada en estos experimentos es confiable, se hicieron experimentos control para reproducir los resultados de Ochs et al (1969).

A) EXPERIMENTOS CONTROL

En la figura 4 se muestran los resultados de haber aplicado 3H -leucina en el GI-7 y de haber dejado pasar 6 y 8 h desde la inyección del marcador hasta el momento del sacrificio. En estos experimentos no se aplicaron ligaduras. Como puede verse en esta figura, conforme pasa el tiempo, el frente de onda se desplaza en sentido proximodistal. Dividiendo la diferencia de distancias dada por la posición del frente de onda, en los dos experimentos arriba mencionados, entre el tiempo transcurrido en cada uno de ellos (la diferencia de tiempo entre los dos experimentos), se puede calcular la velocidad máxima a la que avanzan las proteínas en su viaje anterógrado y de hecho así se ha calculado esta velocidad (Ochs et al 1969). La velocidad así obtenida fue de 17.6 mm/h, la cual es compatible con las calculadas anteriormente (Ochs, 1963 y vease la tabla 1).

En los casos propiamente experimentales, se utilizó el segmento de 3.5 cm a partir de la salida de la fosa iliaca.

ya que, al momento de aplicar las ligaduras (8 h después de la inyección) se encontró que cada fragmento de 5 mm tiene casi igual contenido de marca ya que, como se ve en la figura 4, esa es la zona de la meseta. Para asegurarnos de que esto es así se hicieron algunos experimentos en los que se estudió la distribución de marca en el segmento entre ligaduras, que se presenta a las 8 h después de la inyección de marcador. Los resultados se dan en la tabla 3. Por otra parte, sabemos que en este segmento habrá proteínas que viajan a diferentes velocidades, o por lo menos habrá las que viajen a velocidad máxima (Muñoz-Martínez et al., 1981) y todas estarán viajando hacia la periferia ya que no se ha encontrado que las proteínas viren su dirección en cualquier punto del axón si no es que encuentran un obstáculo.

B) GRAFICAS DE DISTRIBUCION DE MARCA RADIOACTIVA EN EL SEGMENTO ENTRE LIGADURAS

A las 0.5 h de acumulación (figura 5) el contenido de CPM en los fragmentos del segmento entre dos ligaduras varia poco (de A a F) es decir, la diferencia entre el contenido máximo (en F) y mínimo (en B) de los fragmentos no rebasa la desviación estándar (valores de S menores a 2% y es posible trazar una recta horizontal dentro del intervalo de éstas, además de que son relativamente pequeñas (menores a 2 %). Pero esto mismo no sucede en el fragmento más distal (G) en el que el porcentaje de CPM es el doble del contenido en los demás fragmentos.

Si se compara la figura de 1 h (figura 6) con la e 0.5 h se notan las siguientes diferencias porcentuales: a la

hora, el contenido de marca de los fragmentos más proximales es menor (2.19 %, 5.41 % y 3.04 %; A, B y C, respectivamente). El contenido de los fragmentos más distales es casi el mismo en ambos casos; la diferencia en cada uno de estos fragmentos distales es de 0.37 %, de 0.00 % y de 1.09 % en los fragmentos D, E y F, respectivamente; es mayor la cantidad de marca, de estos mismos fragmentos, en la figura de 0.5 h de acumulación. En el caso del fragmento del extremo distal, el contenido de marca es mucho mayor a 1 h de acumulación; la diferencia es de 14.18 %.

En la figura de 1 h de acumulación, existe una diferencia evidente en el contenido de marca de los fragmentos más proximales, respecto a la figura de 0.5 h.

En la figura de 1.5 h de acumulación (figura 7) se puede apreciar que el contenido de marca, particularmente en los fragmentos distales (D, E y F) continúa disminuyendo, a excepción del fragmento más distal donde continúa sucediendo lo contrario.

Al hacer la comparación entre las figuras correspondientes a 1 y 1.5 h de acumulación, es evidente que es en los fragmentos intermedios (C, D y E) donde hay un mayor descenso del contenido porcentual de marca. Las diferencias son de 2.29 %, 3.95 % y 4.46 % en los fragmentos de 1.5 a 2.5 cm. Al igual que en el caso anterior, la radiactividad del fragmento distal continúa en aumento. La diferencia para este fragmento, al comparar su contenido a las 1.5 y 1 h de acumulación, es de 11.52 %.

La suma de las diferencias de los fragmentos proximales al más distal es parecida a la cantidad acumulada en este último lapso de 0.5 h de acumulación (la suma es de 12.38 % y la cantidad de dicho fragmento es de 11.52 %).

En la figura de 2 h de acumulación (figura 8) se aprecia un perfil semejante al de la figura de 1.5 h de acumulación. Al igual que en los casos anteriores, son los fragmentos intermedios (B, C, D y E) los que continúan disminuyendo su contenido de marca, siendo mayor esta disminución en los tres fragmentos adyacentes al distal. Las diferencias son de 1.38 %, 1.75 % y 3.38 % en orden proximodistal, si se comparan las figuras correspondientes a 1.5 y 2 h. En este caso también hay un aumento en el segmento distal (6.15% más respecto al mismo fragmento en el tiempo anterior). En esta figura hay una diferencia fundamental respecto a la anterior: en el fragmento proximal (A) no prosigue el vaciamiento de marca sino que la cantidad de marca de dicho fragmento es mayor. La diferencia en el porcentaje de marca entre la figura de 1.5 h y la de 2 h de acumulación, para ese fragmento, es de 1.86 %.

De las 3 a las 5 h de acumulación ya no se analiza el contenido de marca de los fragmentos cada 0.5 h sino cada hora y de las 5 a las 15 h el análisis se hizo cada 5 h.

En la figura de 3 h (figura 9) se mantiene el perfil que aparece desde la hora y media de acumulación, el cual tiene forma de "U" con el brazo izquierdo de mucho menor altura que el derecho. La diferencia entre esta figura y la anterior (2 h de acumulación) es básicamente igual a la que existe entre los dos intervalos anteriores; es decir, continúa el aparente vaciamiento de los fragmentos intermedios (B a F) y aumenta la marca radiactiva en los fragmentos de acumulación (0.66 % para el proximal A y 3.46 % para el distal G), con la diferencia de que las cantidades acumuladas son menores que en el lapso de 1.5 a 2 h.

En cuanto a la figura correspondiente a las 4 h (figura 10), ésta tiene básicamente el mismo perfil que la anterior, incluso en los fragmentos intermedios. La comparación de esta figura con la de 3 h indica que hay un ascenso general en la cantidad de radiactividad de todos los fragmentos, excepto en el distal que muestra una disminución relativa de 7.02 %. Al hacer la suma de las diferencias de porcentaje de CPM de los fragmentos proximales al de acumulación (B, C y D) en el periodo de 1 h de acumulación, se aprecia que la cantidad que ha aparecido en dichos fragmentos es aproximadamente igual a la cantidad que ha desaparecido del segmento distal de acumulación (la suma es de 7.55 % y la cantidad que ha salido es de 7.02 %).

Conviene notar que en el fragmento más distal (G); en lugar de seguir aumentando las CPM, como sucedía en un principio, el comportamiento se invierte. También debemos mencionar que por primera vez hay, en todos los fragmentos intermedios, un aumento en el contenido porcentual de marca a diferencia de los casos anteriores en que había un descenso.

En la figura de 5 h (figura 11) se aprecia una ligera modificación en el perfil de la distribución de porcentaje de CPM respecto a la figura anterior. Dicha modificación consiste en que, excepto en el fragmento proximal de acumulación, en los fragmentos de la mitad proximal del segmento entre ligaduras (B, C y D) aparecen valores muy parecidos entre sí, por lo que el perfil se hace horizontal, y en los fragmentos distales, a excepción del extremo, el escalonamiento previo es menos pronunciado.

De la comparación de la figura obtenida a las 4 h de acumulación con la de 5 h, resulta que en los cuatro fragmentos

proximales, incluido el de acumulación proximal, existe nuevamente un aumento en el porcentaje. En los tres fragmentos restantes, lo que se observa es una disminución. En este caso, los cambios fueron menores que los de cualquier otra comparación anterior (las diferencias son: 2.1 % la mayor y 0.5 la menor).

En la siguiente figura (10 h de acumulación, figura 12), la distribución de radiactividad se ha modificado notablemente. La tendencia a que los fragmentos intermedios proximales (B, C y D) igualen su contenido, ahora se hace evidente no sólo en estos sino en todos los fragmentos intermedios (B a F). Las variaciones en estos últimos son cada vez menores, la menor de estas es de 0.65 % y la mayor de 1.97 %, comparando las figuras de 5 y 10 h de acumulación. A diferencia de estos fragmentos, en los extremos parece haber una mayor movilidad de la marca y de ambos, el proximal es el que más sobresale, acumulando 8.47 % de marca en 5 h (en el mismo lapso, la radiactividad del fragmento distal ha disminuido en 4 %).

La última figura corresponde al resultado de los experimentos de 15 h de acumulación (figura 13). En esta figura nuevamente, el perfil de proteínas marcadas es en forma de "U", con el brazo izquierdo todavía menor que el derecho.

Al comparar la figura de 10 h con la de 15 h, sólo se aprecian ligeros cambios en los fragmentos intermedios (B a F). En este periodo ha disminuido el contenido de los fragmentos centrales (B, C y D) y aumentado el de los extremos (A y F), excepto el del último fragmento distal, el que aparentemente se sigue vaciando. En general, las diferencias son menores que en el caso de la comparación

anterior.

C) RESUMEN DEL CAMBIO DE NIVEL DE LOS FRAGMENTOS EXTREMOS PROXIMAL Y DISTAL RESPECTO AL TIEMPO

En la figura 14 se resumen los resultados obtenidos en los experimentos de acumulación entre ligaduras si se toma en cuenta sólo el fragmento proximal de acumulación.

En los primeros momentos, es decir, en las primeras horas, hay un rápido decremento en la radiactividad de este fragmento; entre 0.5 y 1.5 h, el contenido ha disminuido en 4.81 %. Además, al parecer entre 0 y 0.5 h el vaciamiento es mayor, si se toma en cuenta el perfil de la curva y se hace una extrapolación aceptando que cuando $h = 0$ el valor porcentual de CPM = 14.28 %. Después de haber sufrido este pronunciado descenso, dicho fragmento recibe aproximadamente 2% de marca en media hora (de 1.5 a 2 h) y a partir de 2 h de acumulación continúa recibiendo material marcado, pero la tasa de acumulación evidentemente es menor. Aunque en el lapso de 2 a 10 h, la cantidad de marca acumulada por intervalo de 0.5 h es menor que en el intervalo anterior, la tasa de acumulación aumenta a cada momento. Por ejemplo, entre 2 y 4 h ha habido un aporte de 1.55 % de CPM y de 7 a 9 h se ha acumulado 3.5 % de CPM. Esta tendencia sólo subsiste hasta las 10 h de acumulación, tiempo durante el cual la cantidad de CPM acumuladas por tiempo se hace menor, ya que por ejemplo, de 10 a 12 h se ha acumulado 1.78 % y de 13 a 15 h la cantidad acumulada es de sólo 0.34 %.

En la figura 15 se presentan los resultados obtenidos tomando en cuenta sólo el fragmento distal de acumulación (G). En las primeras 2.5 horas, el fragmento en cuestión recibe un

gran aporte de material marcado: un 35 % del total contenido en el segmento entre ligaduras.

Al igual que en el caso de la figura 14, pero de manera inversa, después de este periodo de gran acumulación sigue uno de rápido vaciamiento que es máximo entre las 2.5 y las 4 h, siendo la cantidad de CPM desalojadas en este periodo de 6.4 %. Comparativamente, para un lapso igual pero en la fase anterior de acumulación, tenemos que la cantidad que recibe dicho segmento es de 9 %, es decir, se mueve 2.6 % más de marca en el caso de la fase de acumulación respecto a la de vaciamiento rápido.

Después de haberse dado esta rápida desacumulación, el fragmento distal de acumulación sigue perdiendo marca radiactiva (la cual, obviamente, es cedida a los fragmentos más proximales), pero con menor velocidad. Si se toma un lapso de 1.5 h de acumulación (igual al de la rápida desacumulación), tenemos que la cantidad que se vacía es de aproximadamente 1.37 % en promedio ($N = 7$, S.D. = 0.66), la cual, comparada con el 6.4 % de CPM que se mueven en la fase de desacumulación rápida, hace evidente que después de las 4 h de acumulación, la velocidad de desacumulación es menor a la de aquella fase.

Por último, es necesario aclarar que no se hicieron experimentos de más de 15 h de acumulación ya que es probable que a mayores lapsos el deterioro del sistema de transporte produzca resultados falsos, si tomamos en cuenta que los primeros signos anatómicos de degeneración axonal se producen alrededor de las 24 h después de la sección axonal (Lubińska 1964).

V DISCUSION DE RESULTADOS

A) CANTIDAD DE MARCA TRANSPORTADA

Centraremos la discusión en las figuras 14 y 15 que son el resumen de nuestros resultados.

En la figura 14, el aumento inicial en el nivel de marca prácticamente es monótonico, lo cual se pierde antes de alcanzarse el máximo aproximadamente a las 2.5 h. El incremento durante este periodo indica que hay un aporte neto hacia este fragmento, aunque según parece (véase abajo), no sólo está llegando material sino que a la vez está saliendo una parte de éste, pero en menor cantidad. Si la cantidad que llega es mayor que la que sale, entonces, el resultado neto sería el de una acumulación. Con el propósito de aclarar esta situación se trazó una curva teórica de acumulación para lo cual se tomaron en cuenta ciertos hechos conocidos y suponiendo que: 1) todas las proteínas viajan a la misma velocidad y que ésta es la velocidad máxima del transporte anterógrado (17.6 mm/h) y 2) que éstas sólo se acumulan en el extremo distal, es decir, suponiendo que no regresan. A esta curva se le han restado las proteínas que, se calcula, han quedado retenidas a lo largo del nervio con base en lo encontrado por Muñoz-Martínez et al. (1981). En la sección de "Materiales y métodos" se describe el procedimiento utilizado para calcular estas cantidades.

Para calcular los valores de acumulación teóricos utilizamos las siguientes fórmulas:

$$Ca = P + (nr)(C_{em} - C_{cm})$$

donde: Ca = cantidad de marca previa en dicho fragmento del extremo

distal

P = cantidad de marca previa en dicho fragmento (que anteriormente establecimos como 14.29 % de CPM)

mr = milímetros recorridos cada 0.5 h (o sea, 8.8 mm, calculado con base en la velocidad máxima del transporte anterógrado, es decir, 17.6 mm/2 = 8.8 mm/0.5 h)

C_{mm} = cantidad de marca retenida por cada mm, lo cual se calculó así: CPM retenidas en 35 mm = 28 %; a esto se le restó lo retenido en el último fragmento (ya que eso ya está en el fragmento de acumulación distal y es donde se hacen los cálculos).

Entonces, 28 % - 3.78 % = 24.22 %, que es lo retenido en los restantes 30 mm. En conclusión: lo retenido por mm es 24.22% / 30 mm = 0.807%.

C_{mm} = cantidad de marca total por cada mm (= 100 % / 35 = 2.86 % /mm)

Con las cantidades conocidas tenemos:

$$C_a = 14.29 + ((mr)(2.86 - 0.807)) = 14.29 + ((mr)(2.05))$$

Esta fórmula nos dió los siguientes valores que son con los que hemos construido la curva teórica (fig 15 [*]):

h	mr	% CPM acumuladas (C _a)
0.0	0.0	14.29
0.5	8.8	32.32
1.0	17.6	50.36
1.5	26.4	68.40
1.7	30.0	75.78
(1.85)	(32.5)	(80.91)

Nota: tomamos como máximo una distancia de 30 mm que sería a la cual las proteínas más proximales (más cercanas a la ligadura proximal) entrarían al último fragmento (a). Se incluyó una distancia de 32.5 mm que sería la distancia a usar si se utilizasen valores medios en los cálculos. En la discusión hemos utilizado la distancia de 30 mm como

máximo.

Si se toman los valores de la curva teórica como 100%, tenemos que la diferencia con la curva real es de aproximadamente un 23.36 % (tabla 4), es decir, que esa cantidad, o no ha llegado al fragmento distal o ya regresó hacia fragmentos proximales. Esto se explica porque además de que las proteínas no viajan todas a la misma velocidad, existe la posibilidad de que algunas proteínas regresen desde un principio (desde el momento de aplicar las ligaduras.

Si las proteínas viajasen todas a 17.6 mm/h, las que se encuentran más lejos del fragmento distal, es decir, las que vienen desde el extremo proximal, llegarían al extremo distal aproximadamente a las 1.7 h, como lo marca la curva teórica. Sin embargo, el máximo se alcanza entre las 2 y 3 h. Entonces, hay proteínas que viajan más lentamente.

Posteriormente explicaremos porqué es posible afirmar que las proteínas comienzan a regresar desde el momento en que se aplican las ligaduras, por lo que la diferencia entre la curva teórica y la experimental se debe a la combinación de ambos factores, es decir, a que no todas las proteínas viajan a la misma velocidad máxima de 17.6 mm/h, lo que también ha sido probado por otros autores en otro tipo de experimentos (vease Grafstein, 1980, págs. 1184 a 1186) y a que éstas no sólo se acumulan en los fragmentos extremos sino que una parte comienza a regresar desde un principio, es decir, desde el momento de aplicar las ligaduras.

Entonces, podríamos establecer que la diferencia de 23.36 % de CPM corresponde a proteínas recién

sintetizadas que han regresado y, si consideramos que hay cierta contribución que hacen a esta diferencia las proteínas que viajan más lentamente, entonces, este es un estimado máximo del porcentaje de marca que regresa hacia porciones proximales del nervio, con base en las que alcanzan el extremo distal.

Por otra parte, entre el máximo teórico y experimental hay una diferencia de entre 18.18 y 19.50 %, si se toma nuevamente como 100 % el porcentaje teórico. Así, esta cifra es un estimado mínimo de la cantidad de marca que regresa, en relación a la que ha alcanzado el extremo distal. Es un estimado mínimo porque en éste no tomamos en cuenta el material que ha regresado nuevamente y con anterioridad hacia el extremo distal. De esta manera, en el lapso de 2.5 h ha regresado un total de entre 18.18 y 19.50 % de CPM de lo que teóricamente debería llegar.

Estas cifras sólo establecen el intervalo en el que debe encontrarse el valor de la cantidad de proteínas recién sintetizadas que regresan hacia el extremo proximal.

Después de haber alcanzado el máximo mencionado ocurre un descenso, lo que significa que ahora hay un vaciamiento neto en el fragmento del extremo distal. Aunque siga llegando material marcado (y es lo más probable; véase Muñoz-Martínez et al., 1981), la cantidad que sale es mayor y el resultado neto es un vaciamiento. Esta tendencia continúa hasta el final del periodo experimental. Nótese que a partir de aproximadamente 4 h, la pendiente del descenso es menor. El significado de esta inflexión se discutirá más adelante. En la figura 14, correspondiente al fragmento de 5 mm del extremo proximal, hay inicialmente un descenso en el nivel de marca. El mínimo se alcanza aproximadamente a las 1.5 h y enseguida se

inicia un ascenso en el nivel de radiactividad. La pendiente de esta última fase y las pequeñas cantidades que se acumulan en este fragmento, en comparación con los del extremo distal, indican que también regresan, en dirección proximodistal, muchas más proteínas de las que alcanzan el fragmento del extremo proximal (de acuerdo a las cantidades que salen del extremo distal). Esto se confirma porque el cambio de pendiente que se da aproximadamente a las 4 h, en el fragmento del extremo distal, implica la llegada de una gran cantidad de material.

Después de las 1.5 h hay una tendencia a la acumulación neta de material en el fragmento del extremo proximal, esto indica que está llegando más material del que sale, aunque la tasa de acumulación es mucho menor que en el caso de acumulación en el fragmento del extremo distal. Al extrapolar la curva entre las 3 y 4 h, como una recta, para el caso del extremo distal (fig. 15) y tomando en cuenta el cálculo teórico de que al extremo proximal debe llegar un 4.54 %, vemos una diferencia de aproximadamente un 5 % entre la curva extrapolada y la real (tabla 4). Esto implica también que una gran cantidad de material, del que debe alcanzar el extremo proximal, vuelve a llegar hasta el extremo distal.

El máximo de la curva experimental es 18.42 % menor que el máximo teórico. Como a la curva teórica se le restó la cantidad de proteínas retenidas a lo largo del axón, se calcula que éstas son las que deberían llegar al extremo distal. Así entonces, hay un 18.42 % que no se ve que se llegue a acumular en el fragmento distal. Como enseguida al máximo experimental hay un descenso (el aporte es menor que la salida), esto implica que ahora la tendencia

rincipal es a que las proteínas se dirijan hacia el soma. La diferencia entre el máximo real y experimental se puede deber a que las proteínas no sólo se acumulan en el extremo distal sino también a que regresan, a que llegan menos proteínas por unidad de tiempo (es decir, que hay una cantidad que viaja más lentamente), o a la combinación de ambos factores. Al comparar las figuras resumen del movimiento de marca en los extremos, es evidente que en el distal se mueven cantidades mucho mayores (un orden de magnitud mayor en el distal en comparación con el proximal). Una posible explicación a esto es que, en un principio, todas las proteínas marcadas que se mueven, primero tienen que pasar por el extremo distal, es decir, en las condiciones iniciales existe una direccionalidad preestablecida. Es probable que esto no sea suficiente para explicar porqué se mueven cantidades mayores de marca en el extremo distal ya que extrapolando como una recta la curva que hay entre las 3 y 4 horas en el extremo distal, en la primera hora a partir del cambio de pendiente (4 a 5) hay una diferencia de 5 % entre la curva extrapolada y la real. Esta cantidad es mayor a la que se acumula en el extremo proximal en el periodo de 1 h correspondiente (6 h a 7), si se toma en cuenta que, de viajar a velocidad máxima, las proteínas que pasan por el extremo proximal en ese periodo tardan 2 horas en llegar al extremo distal. En otras palabras, lo que se propone es que existe una tendencia a que las proteínas recién sintetizadas viajen preferentemente en sentido proximodistal.

B) VELOCIDAD DEL TRANSPORTE RETROGRADO

El descenso inicial de cuentas en el fragmento del extremo proximal, se debe a que hay una salida de material hacia los fragmentos distales. En este caso sólo podemos hablar de una salida de material y no de vaciamiento neto, es decir que, en esta fase no habria entrada y salida de material sino sólo salida ya que, previamente se ha demostrado que cuando se aplica únicamente la ligadura proximal hay un vaciamiento del contenido de marca conforme avanza el tiempo, hasta que se estabiliza dicho contenido en un nivel inferior al inicial (Ochs, 1975). Además, estos resultados, que fueron obtenidos también al repetir los experimentos en nuestro laboratorio (datos no incluidos aquí), permiten afirmar que no regresan proteínas desde cualquier punto del axón distal a la ligadura única, sino que éstas sólo regresan desde la ligadura distal y como consecuencia de haberla aplicado. Además, podemos afirmar que la aplicación de la ligadura no modifica la velocidad del transporte anterógrado, por lo que el ascenso de nivel en el primer segmento distal a la ligadura proximal representa la llegada de material que necesariamente debe venir desde el fragmento del extremo distal y de éste, de la zona mas cercana a la ligadura ya que con microscopía electrónica se ve que la acumulación de partículas se produce en las últimas micras, es decir, en las más cercanas a la ligadura (Smith, 1980). Así entonces, tenemos la posibilidad de calcular la velocidad del transporte retrógrado. Sabemos que la distancia entre un extremo y otro es de 30 a 35 mm, y que el tiempo invertido por las proteínas en hacer este recorrido es de entre 1.5 y 2 h. Al dividir estas distancias entre los tiempos

señalados tenemos una gama de velocidades que oscila entre 15 y 23.3 mm/h, y la media de estas velocidades es de 18.57 mm/h. Esta cifra es muy similar a la de la velocidad máxima del transporte anterógrado (17.6 mm/h). Para hacer este cálculo hemos desechado la posibilidad de que exista alguna latencia para que las proteínas que alcanzan el extremo distal inicien su retorno. Si tal latencia existiese, como lo afirma Bisby (1977), entonces las proteínas viajarían retrógradamente a una velocidad mayor que en dirección anterógrada. Si restamos la media hora que propone Bisby de retardo para el retorno de las proteínas, nuestros datos darían velocidades de entre 20 y 25 mm/h, por lo que el mínimo estimado sería mayor a la velocidad máxima del transporte anterógrado. En una serie de experimentos realizados antes de concluir esta tesis, Raya y Muñoz-Martínez (comunicación personal) encontraron velocidades parecidas para el transporte retrógrado incluso al aumentar a 5 cm la distancia entre las ligaduras. En caso de que en efecto existiese un periodo de latencia, entre el arribo de proteínas al segmento más distal y su retorno hacia la ligadura proximal, al aumentar la distancia debería haber disminuido el intervalo, es decir, la velocidad aparente. Como esto no es así, es poco probable que la velocidad del transporte sea mayor al anterógrado. De igual manera, es poco probable que la velocidad sea menor ya que tendría que proponerse en primera instancia, la existencia de otro sistema de transporte diferente al anterógrado y por lo tanto, la existencia de dos sistemas de transporte con características diferentes en una misma célula, lo cual también parece poco probable ya que las investigaciones al respecto apuntan a confirmar que el sistema de transporte es único para los diferentes tipos de transporte y de neuronas. Por ejemplo, Ochs, como resultado

de sus numerosas investigaciones, llega a proponer la hipótesis unitaria la que afirma que el mecanismo de transporte para las diferentes velocidades y sustancias que se transportan es el mismo. Este se basa en el sistema de microtúbulos que se encuentran alineados a lo largo de axones y dendritas. La diferencia en las velocidades del transporte anterógrado estarían dadas por la afinidad de las sustancias (o sus acarreadores) hacia el sistema de transporte. Así, las que tienen menor afinidad salen más rápidamente del sistema de transporte y las de mayor afinidad lo hacen más tarde (Ochs, 1982a). Weiss (1986), por caminos algo diferentes llega a esencialmente las mismas conclusiones que Ochs, pero Weiss afirma no sólo que el sistema de transporte es el mismo para las diferentes velocidades anterógradas, sino también para las retrógradas. Ikenaka (1986) encuentra que la desorganización de los microtúbulos provocada por colchicina interrumpe el transporte de material en ambos sentidos. El mismo efecto se produjo al aplicar vinblastina (que actúa sobre los filamentos de actina). Por otra parte, Iqbal (1986) encuentra que la calmodulina afecta de igual manera al transporte anterógrado y retrógrado, es decir, que existe dependencia de ambos tipos de transporte de los mismos procesos metabólicos y de la integridad de los microtúbulos. En este mismo sentido Ochs estudia la dependencia del transporte axoplásmico del ATP derivado del metabolismo celular. Al aplicar agentes bloqueadores del metabolismo oxidativo el transporte axonal rápido se bloquea; de la misma manera sucede cuando se interrumpe la glucólisis con ácido iodoacético (Ochs, 1971). Al producir anoxia en los axones, se interrumpe igualmente el transporte; de esta manera, al aplicar un manguillo para producir anoxia local se

interrumpe el transporte y no pasa la onda de avance más allá del manguillo y al quitar éste se reanuda el transporte (Ochs, 1971). La temperatura afecta al transporte anterógrado de manera que podría plantearse la dependencia del transporte anterógrado con procesos metabólicos; a temperaturas menores de 8°C se detiene el transporte. La explicación que da Ochs es que disminuye la velocidad de reacción del ATP para formar puentes cruzados entre neurotúbulos y neurofilamentos que son componentes del sistema de transporte (y que de acuerdo con su modelo uno sería el carril y el otro el vagón de transporte). En 1985 Ochs encuentra que la velocidad de transporte axoplásmico rápido tiene un Q_{10} de 2. Edström y Hanson (1973) aplican cianida, 2,4-dinitrofenol y ácido iodoacético los cuales inhiben el transporte axoplásmico en ambas direcciones; esto es evidencia de que los mecanismos de transporte anterógrado y retrógrado dependen de los mismos procesos generadores de energía. Además, ambos son sensibles a vinblastina, lo que para ellos es evidencia de que ambos tipos de transporte descansan sobre las mismas bases estructurales. Por otra parte, Smith (1980) estudia mediante microcinematografía los movimientos de partículas y encuentra que éstas se alinean a lo largo de los microtúbulos y a ambos lados de una ligadura, lo que para él es evidencia de que estos pueden estar involucrados en el transporte axoplásmico y que, en todo caso, el medio de transporte sería el mismo para ambos tipos de transporte.

De lo anterior, al parecer lo más lógico es proponer que las proteínas inician su retorno desde el mismo momento en que llegan al extremo distal y si pasan algún tiempo en este extremo antes de iniciar el regreso, éste debe ser mínimo.

C) REVERSIBILIDAD DEL TRANSPORTE

Si las proteínas viran su dirección una vez para viajar retrógradamente y alcanzar así el extremo proximal, no hay razón para pensar que éstas terminarán su viaje en las proximidades de la ligadura proximal, sino que por el contrario, lo más lógico es suponer que alguna fracción de este material nuevamente invierte su dirección para dirigirse ahora hacia la ligadura distal. En nuestros resultados encontramos un hecho que indica que lo anteriormente expuesto es lo que sucede. Este hecho se refiere a que, en la figura resumen correspondiente al fragmento del extremo distal (figura 15), la pendiente que se aprecia después del máximo (2.5 h aproximadamente), se hace menor. La interpretación que le hemos dado a este hecho es que la tasa de acumulación disminuye (las pendientes aproximadas son: -6.33, para el periodo de 2.5 a 4 h y de - 0.91 para el de 4 a 15 h) debido a que aumenta el aporte de material como consecuencia de la llegada de material que alcanza este punto por segunda ocasión. A este aporte se sumarán las proteínas que hacen su primer viaje anterógrado, pero que viajan muy lentamente. El intervalo en el que se produce el cambio de pendiente coincide aproximadamente con los cálculos para que las proteínas que viajan más rápido completen un viaje redondo a la misma velocidad calculada. La distancia es dos veces la longitud del segmento entre ligaduras y el tiempo al que se da la inflexión es a las 4 h. Si se toma una distancia media de 65 mm (2×32.5 mm) y el tiempo indicado, tenemos que la velocidad sería de 16.25 mm/h (o $65/4$), cifra que también es cercana a la de la velocidad máxima del transporte anterógrado. Este

hecho también lo hemos tomado como una evidencia de que la velocidad máxima del transporte retrógrado es similar a la del anterógrado.

D) EL METODO

Los resultados de nuestros experimentos están en contradicción con los obtenidos por Bisby y Bulger en 1977 y por Bisby y Buchan en 1981 (y reafirmados por el primer autor en 1982). Creemos que las diferencias en los resultados se deben a que el método utilizado por Bisby es diferente al nuestro.

El método utilizado por Bisby y Bulger en su trabajo publicado en 1977 es el siguiente: Una o seis horas después de haber aplicado ^3H -leucina, ya sea en el 5° ganglio lumbar, o en las raíces ventrales de la médula de la rata, procede a aplicar una ligadura distal a unos 50 mm del ganglio. Enseguida aplica sus ligaduras colectoras a tiempos variables y aproximadamente a 15 y 25 mm proximalmente a la ligadura distal. Finalmente da un período de 2 ó 3 horas más a lo que llama periodo colector y sacrifica al animal para extraer el nervio y analizar la distribución de marca radiactiva en el mismo. Para calcular las velocidades y las cantidades que se mueven con el transporte retrógrado utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Acumulación relativa} = ((\alpha/\beta) - 1/T) + 1$$

donde: α = actividad (CPM) en el fragmento de 2 mm proximal a la ligadura colectora proximal, o distal a la ligadura distal; el primer caso cuando es acumulación entre ligaduras y el segundo cuando se trata de acumulación de proteínas que vienen desde

las terminales (fragmentos de acumulación, fig. 1).

β = nivel preexistente de actividad en los fragmentos de acumulación, determinado por interpolación a lo largo del gradiente proximodistal de actividad no móvil que hay en el nervio ciático.

Para el caso de acumulación proximal (desde el soma a ligadura proximal) la fórmula es la misma pero los términos cambian:

β = (actividad en el fragmento aislado + actividad en igual longitud de nervio proximal al fragmento de acumulación) / longitud del fragmento aislado.

Para el caso de acumulación distal (desde terminales o entre ligaduras)

β = (actividad en el fragmento aislado + actividad en igual longitud de nervio distal al fragmento de acumulación) / longitud del segmento aislado.

Para ambos casos

τ = intervalo (h) entre la aplicación de las ligaduras colectoras y la remoción del nervio.

De acuerdo a su planteamiento cuando no hay acumulación en las ligaduras colectoras entonces $\alpha = \beta$ y la acumulación relativa = a 1. Esto quiere decir que toma como inicio de la acumulación del material el momento en el que las proteínas marcadas rebasan el nivel inicial de 1, a diferencia de lo que se hace en el presente trabajo que es tomar como inicio de acumulación de proteínas cuando, después de haberse dado un vaciamiento del fragmento proximal de acumulación, comienza a subir el nivel de marca. Entonces, se considera que de 0 a 1, en referencia al trabajo de Bisby, ya hay cierto grado de acumulación de material. En todo caso, si éste autor

hubiese hecho el mismo razonamiento habría tenido resultados más parecidos a los que se han obtenido en esta tesis.

Desde nuestro punto de vista los siguientes son algunos de los posibles errores en este trabajo de Bisby:

a) Al aplicar primero las ligaduras distales y después, a tiempos variables, las ligaduras colectoras proximales, deja abierto el aporte de proteínas provenientes del soma. No se sabe cuál es la importancia de esta contribución de material y cómo afecta a los resultados.

b) Para calcular la cantidad de proteínas acumuladas mediante el transporte retrógrado toma como referencia la cantidad de material "preestablecida" (previa) que se encuentra en los fragmentos intermedios de su segmento comprendido entre las ligaduras colectoras y también la cantidad presente en fragmentos distales al fragmento inmediato distal a la ligadura distal.

c) Otros posibles errores son que, como toma en cuenta el pico máximo de acumulación de marca para calcular la velocidad retrógrada, en todo caso lo que tendría sería la velocidad de las proteínas que llegan al último, es decir, las más lentas o las que aún no llegan a la ligadura distal y por lo tanto tuvieron que viajar una mayor distancia.

Bisby supone que las proteínas transportadas retrógradamente llegan a la ligadura colectora al término del periodo de colección de 2 ó 3 horas por lo que entonces, tiene una incertidumbre de por lo menos 2 horas. Y por último, no aclara nunca qué pasa con las proteínas que alcanzan el extremo proximal mediante el transporte retrógrado. Para nosotros es claro, y se concluye del trabajo aquí expuesto, que las proteínas inician nuevamente un viaje

anterógrado una vez que alcanzan el extremo proximal y, lo más probable es que al llegar nuevamente al extremo distal, una fracción revierta nuevamente su dirección y así continúe sucediendo mientras haya proteínas transportables (móviles) y el sistema de transporte siga funcionando.

Nuestro método, aunque parecido al de Bisby, nos permite tener condiciones confiables y conocidas al inicio de la maniobra experimental. En esta tesis, el punto de partida es una distribución de marca casi uniforme para cada fragmento de 5 mm (14.2 % para cada uno) y con toda seguridad, el conjunto de proteínas marcadas que se dirigen en ese momento cero, hacia las terminales nerviosas. Con esto, nuestro punto de referencia (la distribución uniforme inicial), es el mismo, sin que las variaciones de un experimento a otro afecten las condiciones iniciales. Así mismo, el manejo experimental que hacemos nos permite calcular la velocidad del transporte retrógrado de una manera más directa que la de Bisby.

Por otra parte, nuestro método presenta diferentes inconvenientes. Uno de estos es que, el segmento de nervio con el que trabajamos no puede ser más largo (lo cual podría ser más conveniente ya que la cantidad de material en movimiento sería mayor y las diferencias, momento a momento, más claras) ya que entre más largo sea el fragmento, los intervalos de tiempo serían mayores; por ejemplo, las proteínas del fragmento extremo proximal requerirían más tiempo para llegar al extremo distal debido a que tendrían que viajar una distancia mayor y lo mismo sucedería para que las proteínas marcadas alcanzasen el extremo proximal por medio del transporte retrógrado.

El hecho de que aproximadamente a las 24 h un

segmento de nervio aislado de ciático comienza a degenerar, impone un límite a nuestros experimentos y básicamente por esta razón no podemos trabajar con segmentos aislados de nervio más largos (Lubińska, 1964). También en los experimentos del presente trabajo se presenta la limitante de 24 h.

Aunque nuestras estimaciones son más directas que las de Bisby y otros investigadores (por ejemplo, Bray, 1971 y Sjöstrand y Frizell, 1975), aún no son directas. Por ejemplo, para calcular la velocidad del transporte retrógrado no medimos directamente lo que avanzan las proteínas en el tiempo y en dirección distoproximal, sino que, lo que tenemos son los momentos en que las proteínas llegan a los extremos y a partir de esto y de las distancias recorridas (ya conocidas), es como calculamos la velocidad. Nuevamente, para resolver estas incertidumbres se hace necesario hacer un estudio más formal, que incluya un modelo matemático del fenómeno que explique los resultados y permita hacer predicciones y poder confirmar o rectificar lo aquí establecido.

En resumen, del presente trabajo se concluye que la velocidad del transporte retrógrado rápido es similar a la del anterógrado rápido (17.6 mm/h). Trabajos posteriores a este, que se realizan en el mismo laboratorio, apoyan dicha afirmación. Otra conclusión es que en el extremo distal se mueven cantidades de material marcado mayores que las observadas en el extremo proximal; una explicación a esto sería que al principio del experimento existe una direccionalidad previa, la cual permite que lleguen inicialmente más proteínas al extremo distal.

También se desprende de esta tesis que del

total de proteínas del segmento entre ligaduras regresa al extremo proximal (después de haber llegado al extremo distal) entre 18.18% y 23.36%.

1960	Miani	^{14}C -val, ^{14}C -treo	aplicación en calamus scriptorius; usa nervio hipogloso y vago; aplica ligaduras; hace autorradiografía y cromatografía	encuentra marca en segmento entre ligaduras lo cual podría ser evidencia de transporte
1960	Verne y Droz	^{35}S -met	inyección intraperitoneal; hace autorradiografía	mayor presencia de marca en fibras d GI, tal vez implique transporte
1961	Takahashi	^{14}C -gli, ^{14}C -leu	incuba (4h) nervio ciático y corteza cerebral de conejo	metabolismo de proteínas en sección; > concentración de marca en proteínas solubles en NaCl
1961	Clouet	AChE	inhibición de la AChE	restauración de actividad en gradiente proximodistal
1961	Miani et al	^{14}C -treo, ^{14}C -val, ^{14}C -gli	cromatografía en papel	velocidad de recambio de proteínas
1961	Koering	AChE	inhibición de la AChE con DFP	comprueba el transporte de la AChE
1962	Ochs et al	^{32}P	inyección en médula espinal de gato; utiliza raíces	vel transporte=4.5 mm/d; al aplicar asa fría se interrumpe el transporte hay independencia del soma
1963	Miani	^{32}P -ortofosfato	aplicación directa en médula oblongata	vel=72 y 39-41 mm/día en nervio vago cervical e hipogloso respectivamente vel recambio, 3 veces la vel de trsp el flujo exponencial implica recambio de proteínas; hay acumulación de P distal a constricción
1963	Lubińska et al	AChA	utiliza peroneo de gato; aplica ligaduras	la velocidad de acumulación de la AChA implica una mayor velocidad de trsp (mayor a 1mm/d); hay acumulación distal y proximal a ligaduras
1964	Miani	^{32}P	aplica el P en calamus scriptorius en 4 ^o ventrículo de conejo; usa nervio vago e hipogloso	acumulación de marca distal y proximal a ligadura; hay movimiento proximodistal y distoproximal
1965	Burdwood	partículas	microcinematografía	la velocidad de trsp. anterógrado debe estar entre las mayores

TABLA 1

A	AUTOR	MATERIAL ESTUDIADO	TIPO DE PROCEDIMIENTO	DATOS OBTENIDOS
*****	Nakai	particulas (vacuolas)	microcinematografia de fibras disociadas y no disociadas	movimiento bidireccional de las particulas
6	Gaitonde	S ³⁵ -metionina	inyección intracisternal y subaracnoidea	velocidad de recambio de proteínas
4	Hebb	ChA	utiliza nervio cervical simpático de ovejas y gatos; secciona el nervio	acumulación de ChA en el extremo proximal a la sección
5	Lotfield	C ¹⁴ -val, C ¹⁴ -Ileu	inyección intravenosa	recambio de proteínas
7	Hebb	ACh	revisión teórica	la ACh producida en el soma y transportada en vesiculas
3	Von Euler	noradrenalina	nervio simpático de bovino; centrifugación	la noradrenalina se produce en vesiculas
3	Koenig	S ³⁵ -met, C ¹⁴ -gli	aplicación directa a cisterna magna o médula (zona lumbar) en nervio ciático; cpm/gr de proteínas; sacrifica 4 a 10h postinyección	velocidad=4-5 mm/d y también 2-11 mm/d; el axoplasma sobrante se cataboliza en el axón y/o terminales
3	Waelisch	C ¹⁴ -lis	inyección intravenosa; uso de plexo y nervio ciático	analiza distribución a 8, 17, 28 y 38 d; a mayor tiempo menor concentración proximal y mayor distal en raras; no en mono
3	Ochs y Bulger	P ³²	inyección directa en zona de raices ventrales y en G1-7, utiliza nervio ciático de gato	compara la concentración en fragmento distal y proximal (seccionados); concluye que hay movimiento hacia la periferia
7	Fukuda	AChE	produce inhibición irreversible de la enzima	la producción de AChE está en relación con la sustancia de Nissi
7	Friede	deshidrogenasa succinica, TPNdiazoforasa, DPNdiazoforasa	utiliza nervio ciático de gato y rata, así como sus raices	concluye que hay transporte de enzimas ya que se acumulan proximalmente a la sección

Ochs	^3H -leu	autorradiografía en raíces ventrales; inyección en G1-7	distribución interna (axoplasma) de la marca
Lasek	^3H -leu	aplicación directa en ganglio de raíz dorsal y médula de gato	vel=1-2mm/d y otra 100 veces mayor; el flujo puede ser hacia periferia o hacia soma; mucho > en axones distales que en raíces
Dahlström	monoamina, catecol- amina y 5-hidroxitriptamina	utiliza nervio ciático de rata y gato; hace doble ligadura	vel=5-6 mm/h en rata y 9-10 mm/h en gato
Mc Ewen y Grafstein	^3H -leu	aplicación directa en ojo de carpa dorada; hace autorradiografía y determinación de radioactividad total en diferentes estructuras	probablemente hayan 2 vel: una de 0.4mm/h y otra mucho mayor a 1.3mm/h recupera leu en mitocondrias y microsomas; no encuentra onda
Grafstein	^3H -leu,	inyección en ojo de carpa; autorradiografía	ve acumulación de granos en tecto óptico en menos de 24 h
Ochs et al	^3H -leu, ^{32}P	aplicación directa a motoneuronas (médula); aplica ^3H -leu sobre nervio; analiza fracciones	mayor concentración en fracción S, poca leu libre; leu sobre nervio no se transporta, tampoco cicloleucina inyectada
Weiss	^3H -leu	aplicación directa en nostrilo de rana	habría canales líquidos por donde se daría el transporte rápido
Kerkut	glutámico, ^{14}C -glucosa, xilosa y arabinosa	aplicación directa <i>in vitro</i> en cerebro y músculo de serpiente y rana; aplica estimulación directa a cerebro; también incubaba	al estimular se da concentración de glutamato; propone al glutamato como neurotransisor; vel=30mm/d; con frío se retarda el trasp; vel trasp de músculo a cerebro=0.62mm/h
Lasek	^3H -leu	inyección en G1-7 de gato; aplica doble ligadura	aprecia acumulación proximal y distal a ligaduras proximal y distal
Ochs	^3H -leu, ^{14}C -leu	inyección en médula; hace radioautografía de segmento distal y proximal	mayor acumulación de marca en fracción S; inhibe transporte con puromicina
Pomerat et al	vesículas y mitocondrias	microcinematografía	visualiza partículas viajando en ambas direcciones y una mitocondria re-

Frizell
et al

³H-leu

usa nervio vago e hipogloso de
conejo; aplica doble ligadura

vel retrograda=200mm/h; de lo que hay
en el segmento se acumula 70% anteró-
gradamente y 16% retrógradamente; se
acumulan mitocondrias, norepinefrina
y proteínas marcadas

TABLA 3

fragmento (cm)	valores de Pf				$\alpha_x = Pf - CPM$ promedio basal	α_x	fragmento valores Pd (tot. CPM entre ligad				fragmento (cm)	Pd (tot. CPM entre ligad			
	exp. 1	exp. 2	exp. 3	exp. 4			exp. 1	exp. 2	exp. 3	exp. 4		exp. 1	exp. 2	exp. 3	exp. 4
0.0-0.5	8700	8800	3600	6000	α_1	8481	8625	3463	5845	0.0-0.5	176837	151825	64123.75	8784	
0.5-1.0	7400	7800	3300	5800	α_2	7181	2825	3163	5645	0.5-1.0	168356	143200	60660.80	81996	
1.0-1.5	7500	8000	2800	5000	α_3	7281	7825	2663	4845	1.0-1.5	161175	135575	57497.85	76352	
1.5-2.0	7500	7200	2800	4600	α_4	7281	7025	2663	4445	1.5-2.0	153694	127750	54834.90	71507	
2.0-2.5	6700	6400	2700	4500	α_5	6481	6225	2563	4345	2.0-2.5	146613	120725	52171.95	67062	
2.5-3.0	6800	6500	2800	4300	α_6	6581	6325	2663	4145	2.5-3.0	140132	114500	49609.00	62717	
3.0-3.5	6400	6500	3000	4100						3.0-3.5	133551	108175	46946.05	58572	

Se han tabulados los datos con los que se calculó el porcentaje de CPM (promedio) retenidas, en relación al porcentaje existente entre ligaduras (%r). Las abreviaturas Pf, Pd, Ir y Cr se explican en el texto (p. 44).

fragmento (cm)	valores Ir				valores Cr				valores %r				% prom (N=4)		S	S/
	exp. 1	exp. 2	exp. 3	exp. 4	exp. 1	exp. 2	exp. 3	exp. 4	exp. 1	exp. 2	exp. 3	exp. 4	S	S/		
0.0-0.5	652.6	2277.4	961.86	1317.6	31.28	26.40	27.78	32.54	4.47	3.77	3.97	3.22	3.86	0.51	0.1	
0.5-1.0	826.3	2148.0	909.91	1229.9	35.16	28.17	28.77	31.79	5.02	4.02	4.11	3.11	4.07	0.78	0.1	
1.0-1.5	2417.6	2053.6	862.47	1145.3	33.20	25.99	32.39	33.64	4.74	3.71	4.63	3.38	4.12	0.67	0.1	
1.5-2.0	1308.4	1416.3	812.52	1072.6	31.83	27.28	30.89	34.13	4.55	3.90	4.41	3.45	4.08	0.50	0.1	
2.0-2.5	1499.2	1810.9	762.58	1005.9	33.93	29.09	30.53	33.15	4.85	4.16	4.36	3.31	4.17	0.64	0.1	
2.5-3.0	1101.9	1717.5	744.14	940.8	31.94	27.15	27.94	32.70	4.86	3.88	3.99	3.24	3.92	0.54	0.1	
3.0-3.5	2003.3	1622.6	704.19	878.6	33.49	25.65	24.80	32.29	4.78	3.66	3.55	3.18	3.78	0.69	0.1	

TABLA 4

hora	% CPM experimental (e)	% CPM teórico (t)	d % exp.-% teor. (e - t = d)	(d)(100)/t
0.5	24.79	32.32	7.53	23.30
1.0	38.50	50.36	11.86	23.55
1.5	50.80	68.40	23.23	23.23
				X=23.36 (N=3)

En esta tabla se agrupan los datos utilizados para calcular la diferencia entre la curva teórica y la experimental para el caso de acumulación en el extremo distal.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1- Esquema del procedimiento utilizado por M. A. Bisby (1977) para determinar la cantidad de proteínas que se mueven por transporte axoplasmico en axones normales y "lesionados".

La explicación de la figura se da en el texto.

Fig. 2- Procedimiento utilizado para la inyección de ^3H -leu.

A) La figura de CPM vs distancia corresponde a un experimento en el que se extrajo el nervio ciático 8 h después de haber inyectado ^3H -leu en el 7° ganglio lumbar; AV = asta ventral, G = Ganglio, M = micromanipulador.

B) En esta figura se muestra la posición de la microjeringa para cuando se hac la inyección; la micropipeta se llena con ^3H -leu y para hacer la inyección () primero se retira el recipiente que contiene la leucina marcada (indicado con).

Fig. 3- Resumen del procedimiento utilizado.

A) En el momento de la inyección la marca se encuentra en el ganglio (en obscuro).

B) Al momento de aplicar las ligaduras la marca ya avanzó hacia las terminales nerviosas y en el segmento de 3.5 cm utilizado para medir la distribución uniforme de la misma ya que corresponde a la zona de el 7° ganglio lumbar; AV = asta ventral, G = Ganglio, M =

de 5 mm de nervio ciático después de haber inyectado ^3H -leu.

La curva de cuadros (■) corresponde a un experimento en el que se inyectó el ganglio 5 h antes de la extracción del nervio ciático; los círculos (○) corresponden al resultado de haber hecho la inyección 9 h antes de la extracción de ese nervio.

La línea punteada representa el corte del nervio ciático que se efectuó 4 h después de la inyección. Nótese que a pesar de la sección al nervio la marca continúa avanzando hacia la periferia a la misma velocidad y sin retraso.

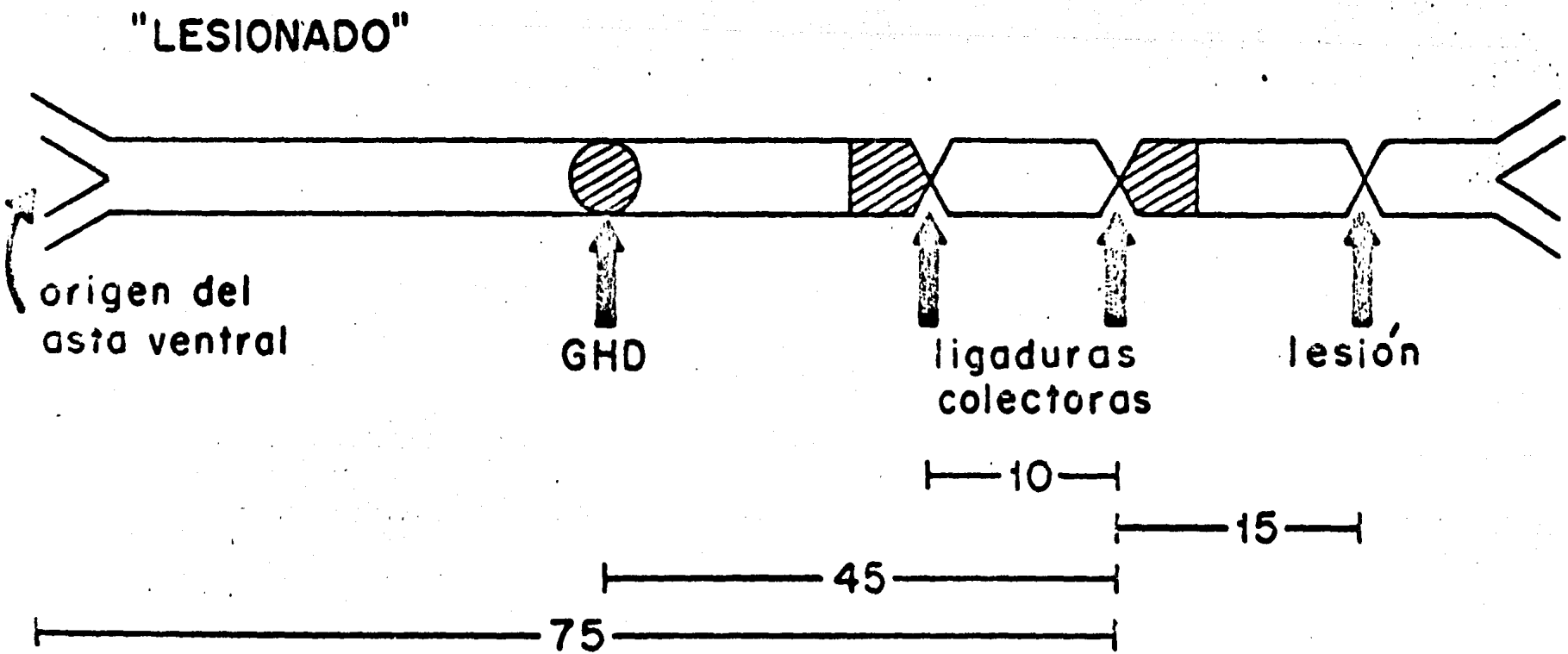
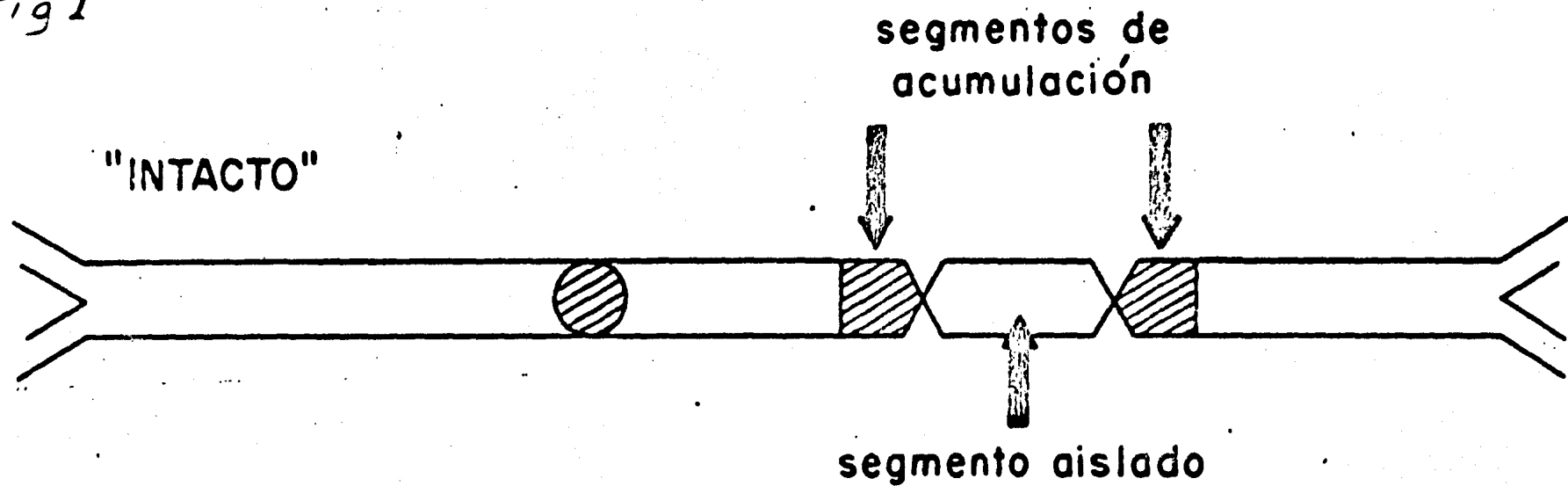
Figs. 5 a 13- Distribución porcentual de marca en el segmento de nervio ciático de 3.5 cm entre ligaduras (total de CPM en el segmento = 100%) a diferentes tiempos de acumulación

La línea punteada inferior corresponde al porcentaje de marca que se calcula queda retenida en cada fragmento de 5 mm de nervio; la línea punteada superior corresponde al cálculo de 14.29% de CPM que debería tener cada fragmento de 5 mm si la distribución de marca al principio del experimento es homogénea.

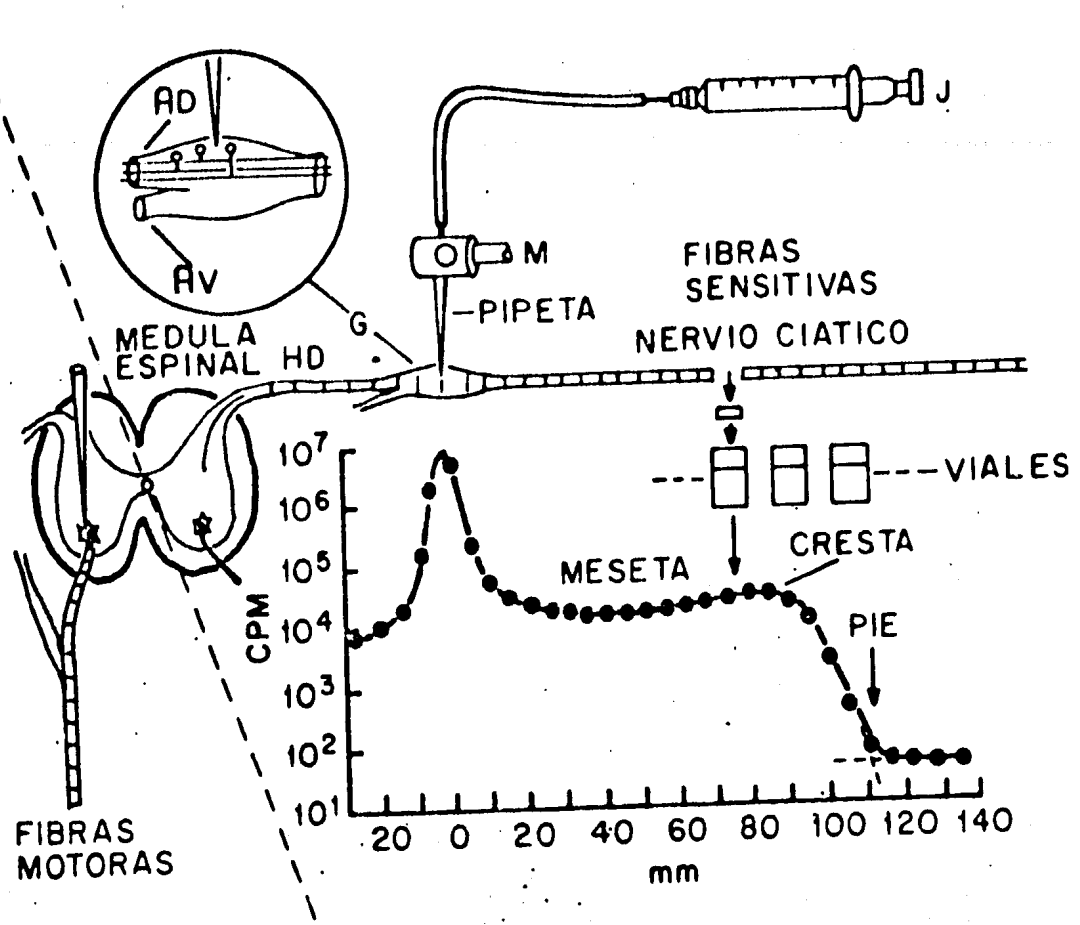
Fig. 14- Resumen del cambio de nivel de CPM obtenidas a los diferentes "tiempos de acumulación" en el fragmento del extremo proximal del segmento de nervio ciático entre ligaduras.

Fig. 15- Cambio en las cifras porcentuales de CPM (100%=total de CPM en el fragmento entre ligaduras) según las "horas de acumulación" para el fragmento del extremo distal del segmento entre ligaduras (con círculos); la curva con cuadros es la que resulta de calcular teóricamente qué cantidad de marca llegaría por unidad de tiempo a este extremo si todas las proteínas viajaran a 17.6 mm/h.

Fig 1



A



B

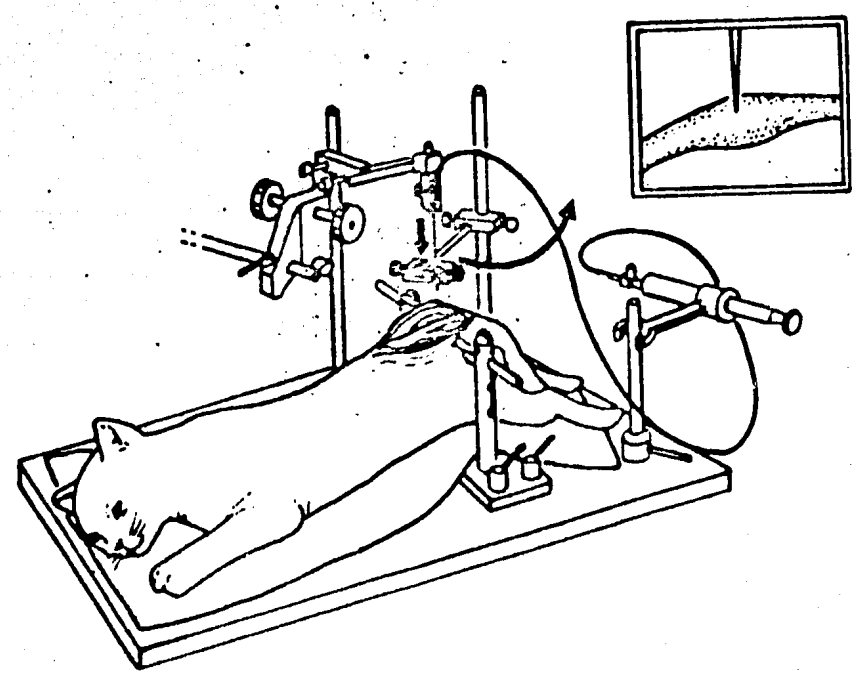
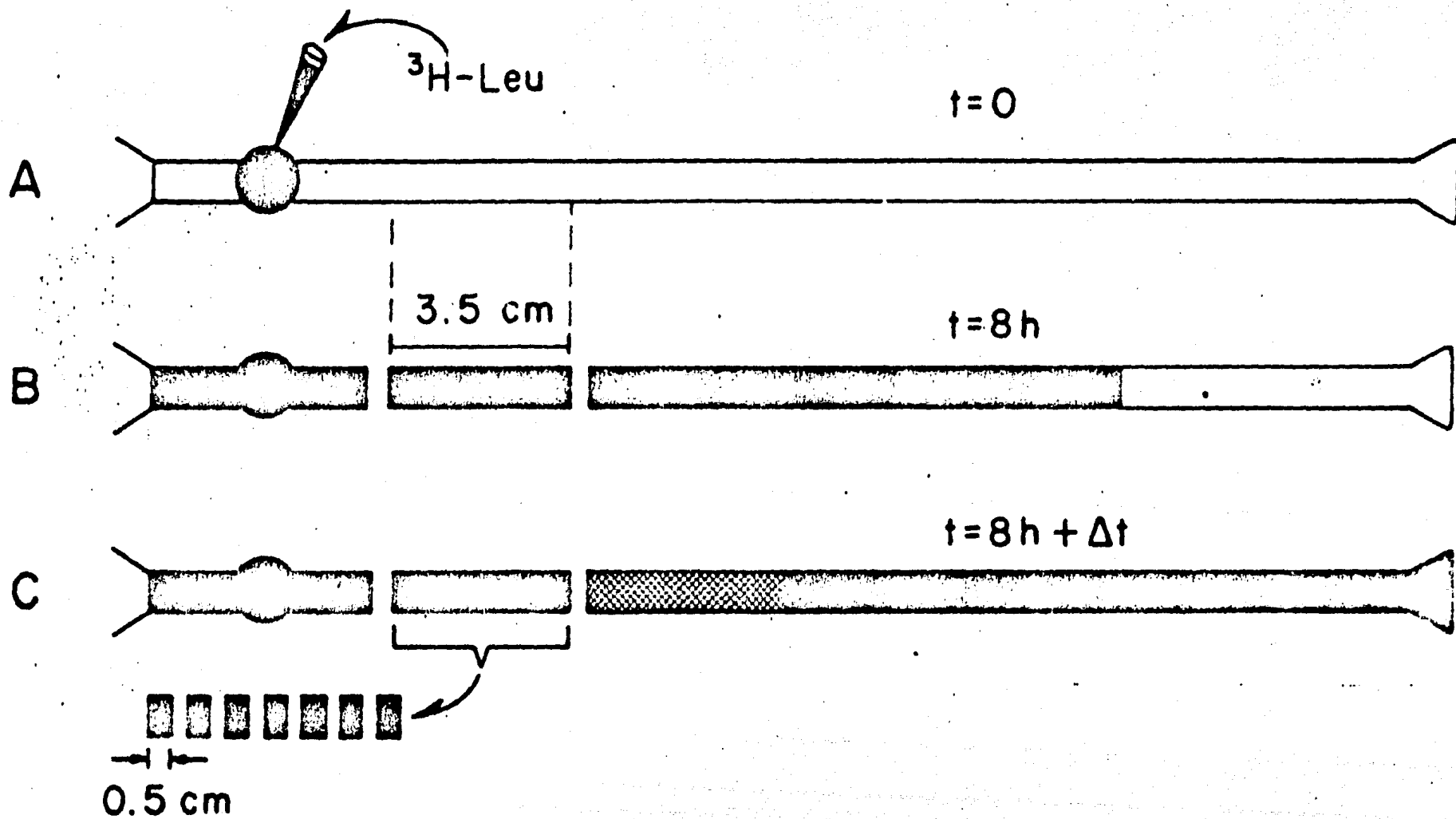


Fig. 2

Fig. 3



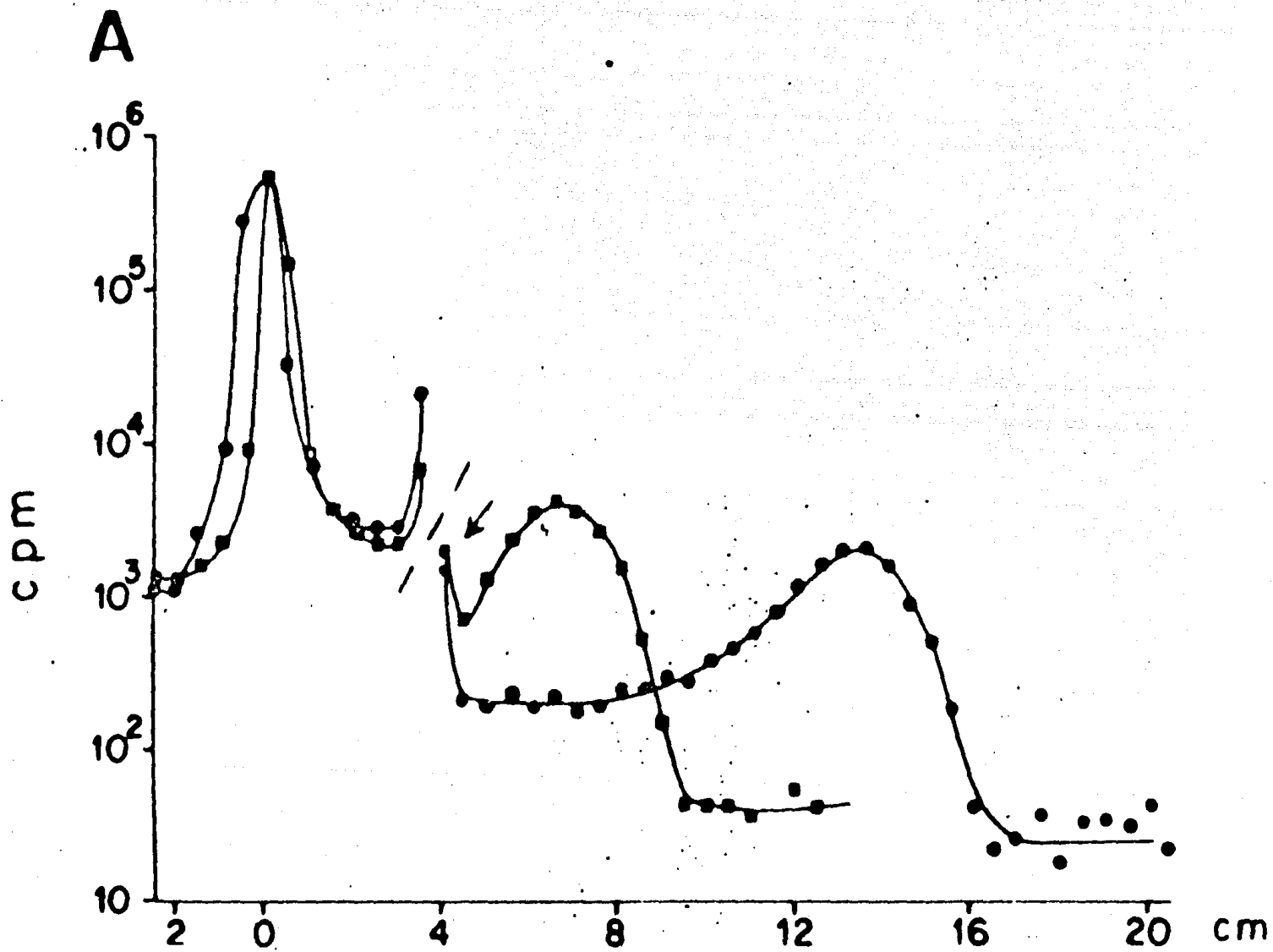
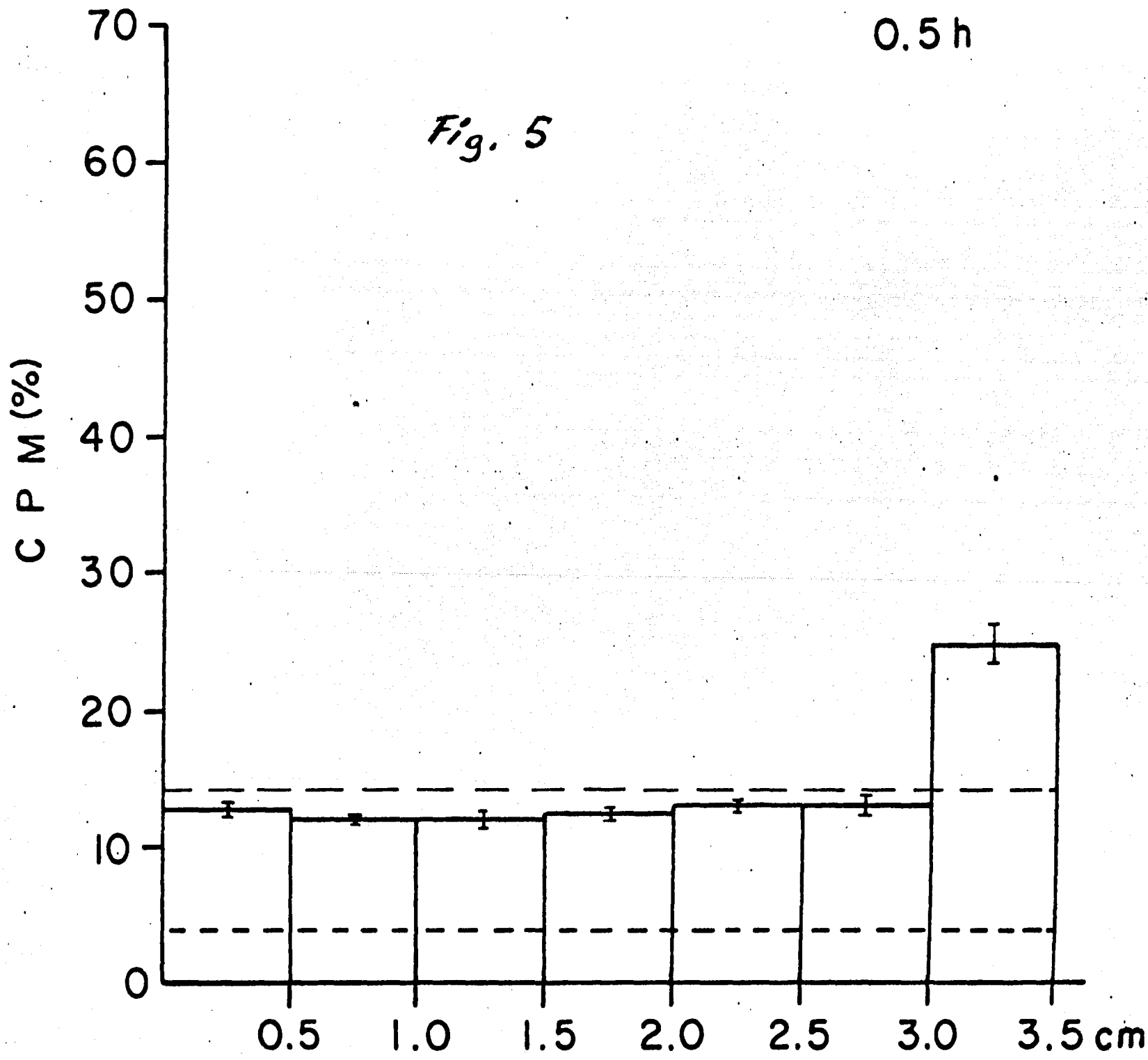


Fig 4

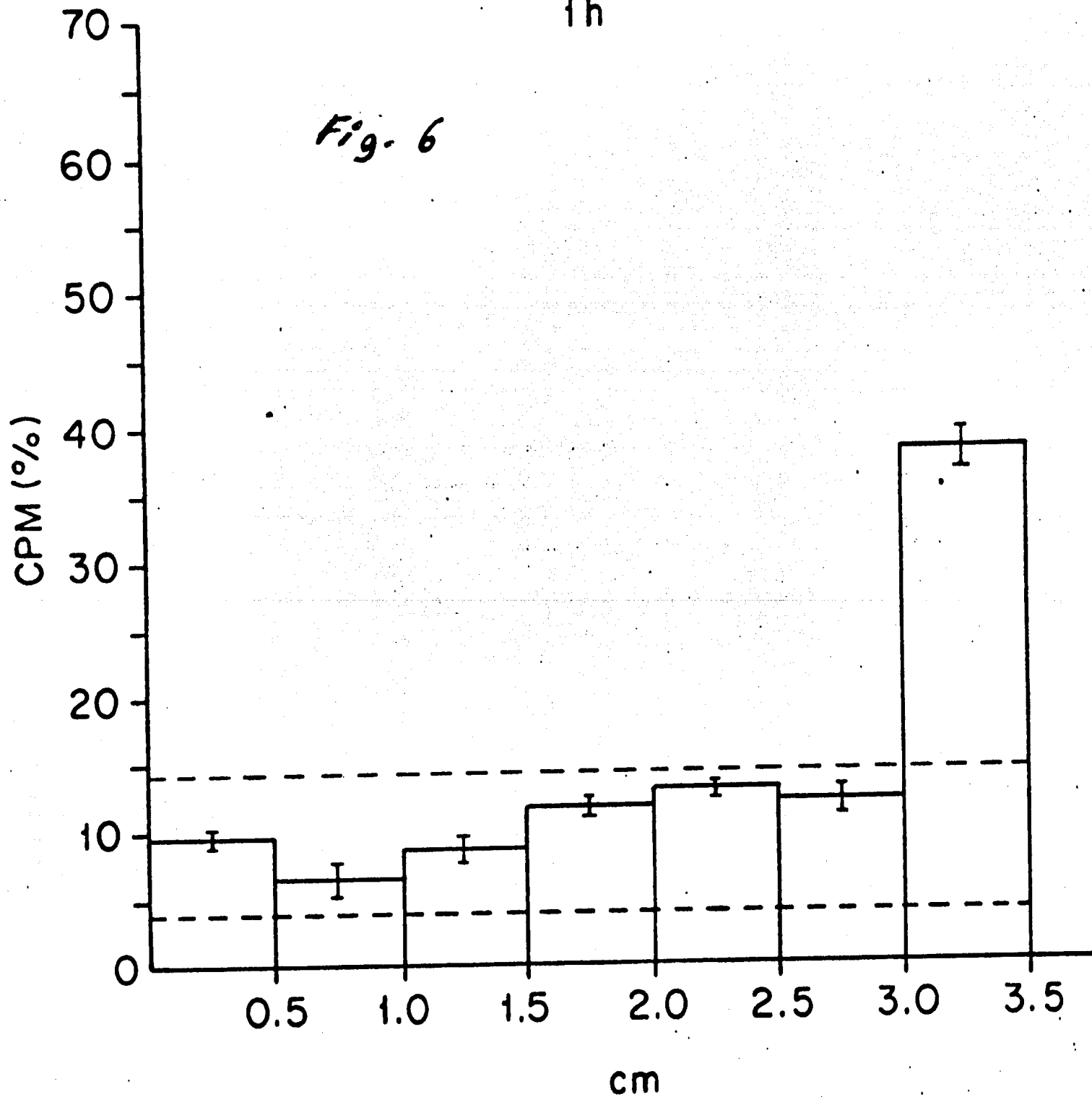
0.5 h

Fig. 5



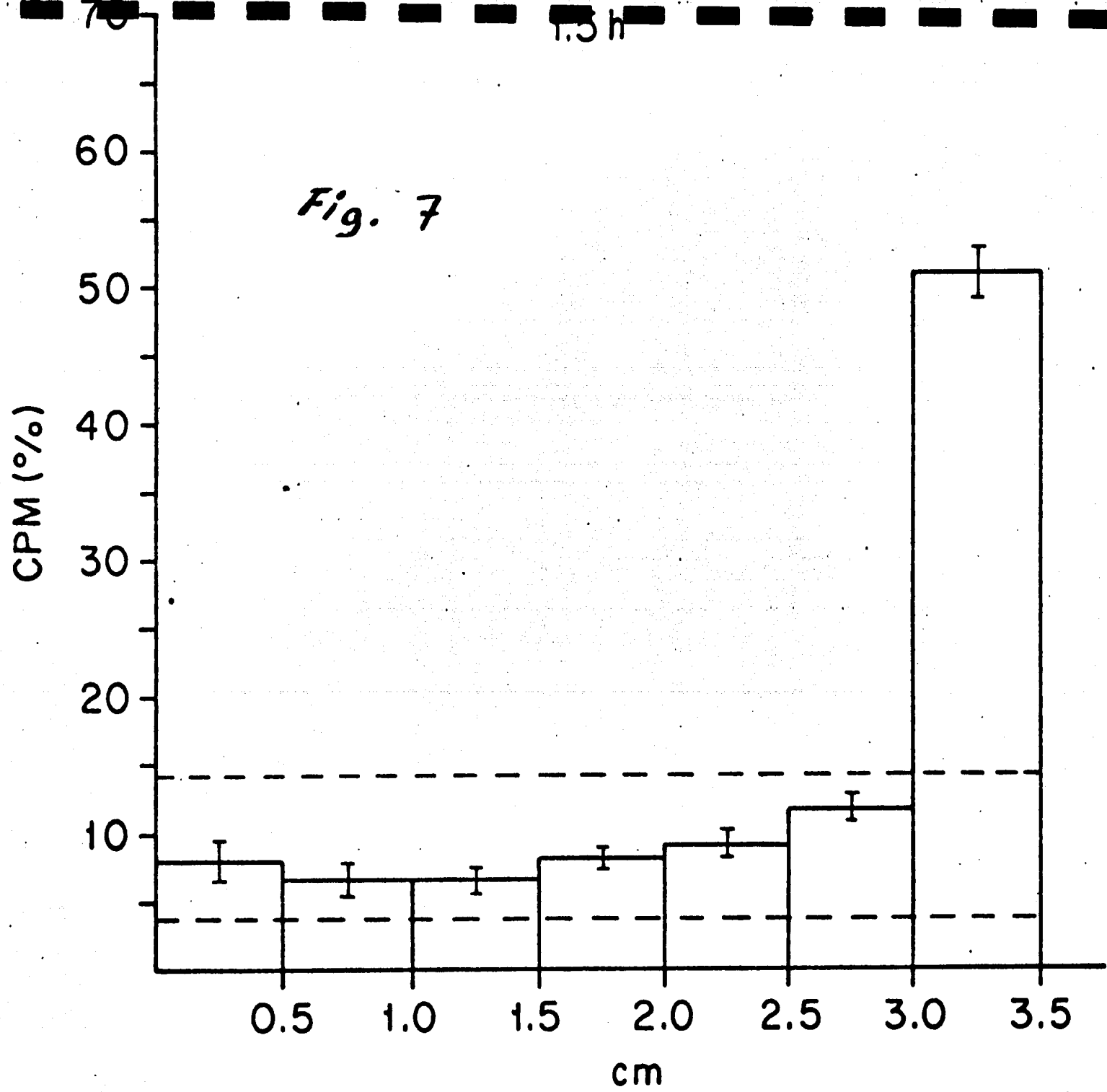
1h

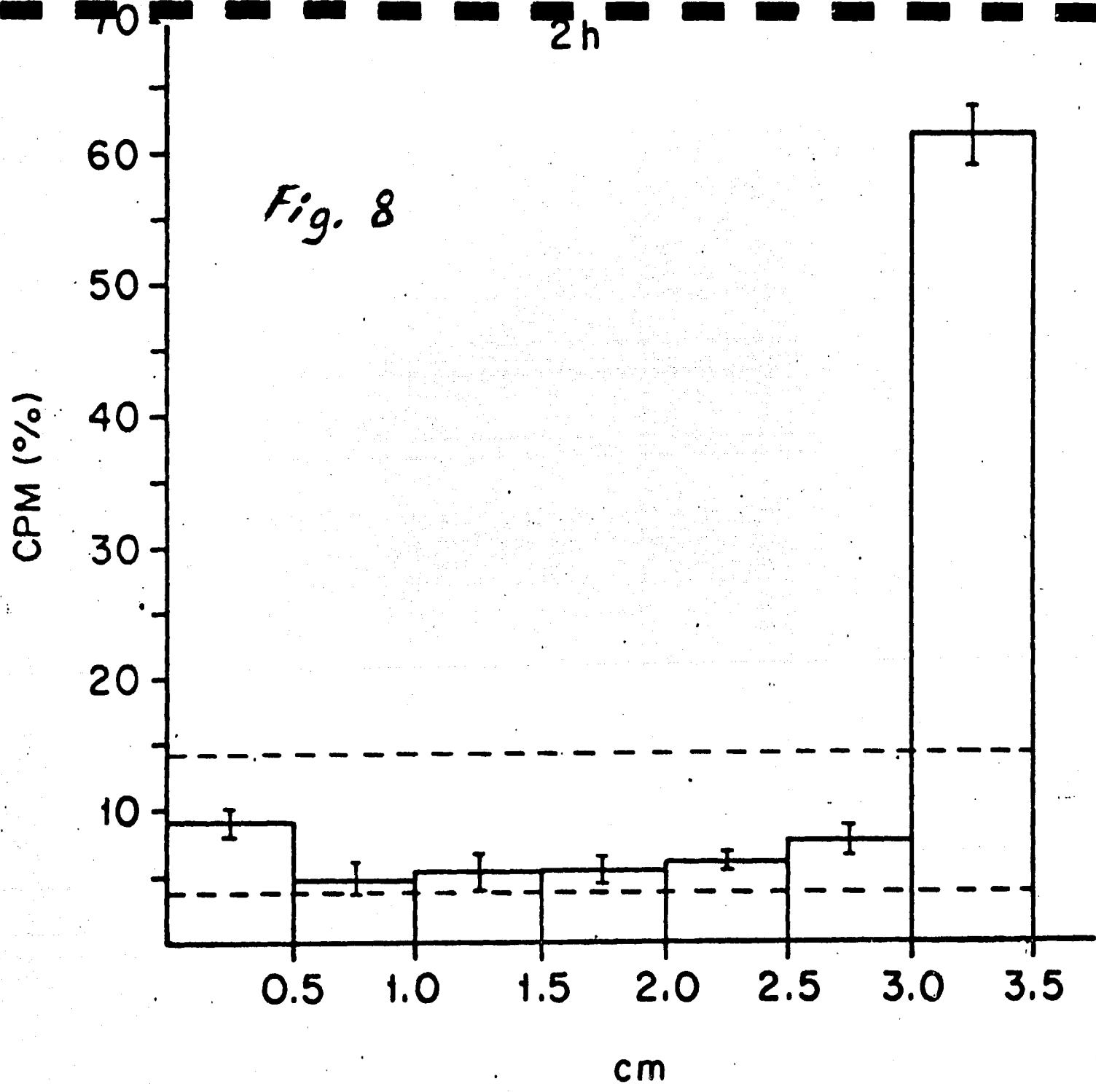
Fig. 6

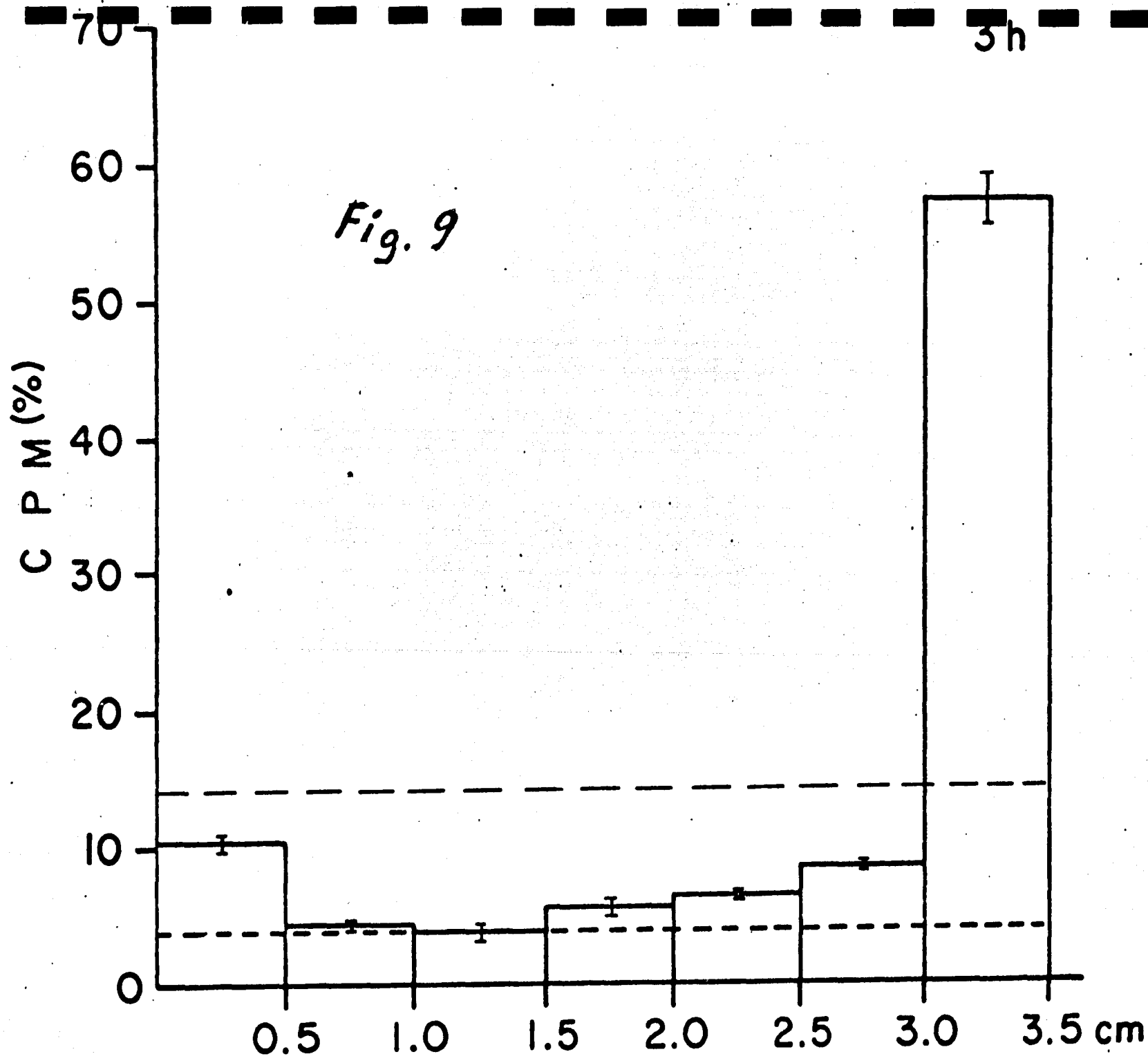


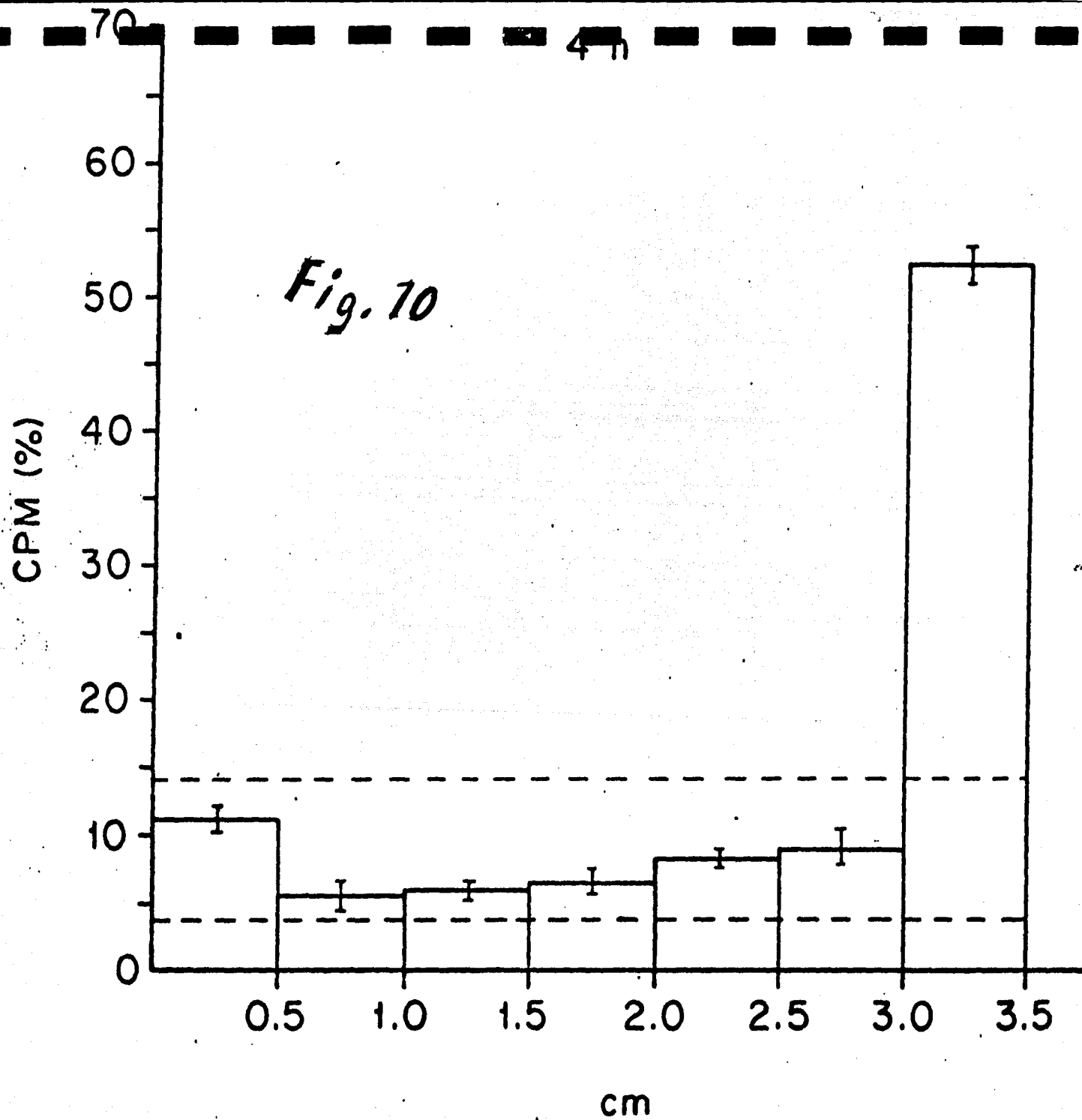
1.3 h

Fig. 7









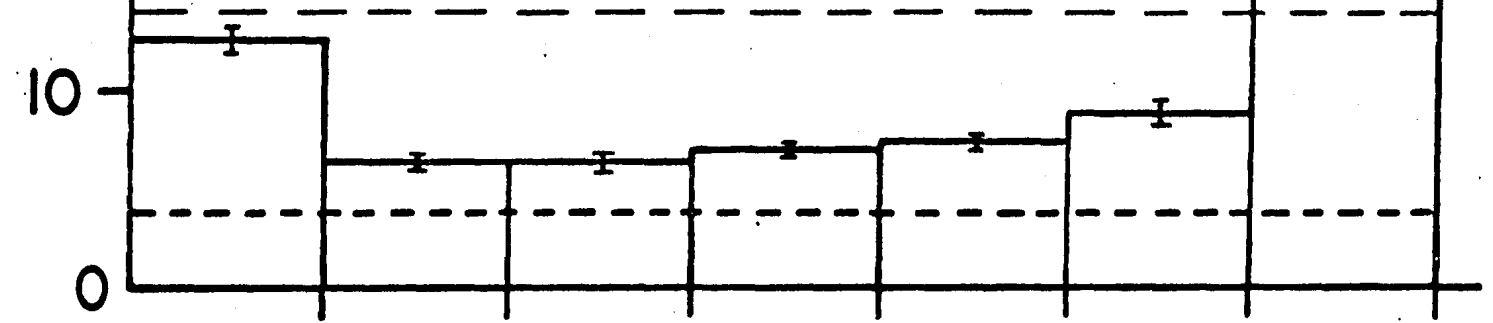
5n

11

C P M (%)

70
60
50
40
30
20
10
0

0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 cm



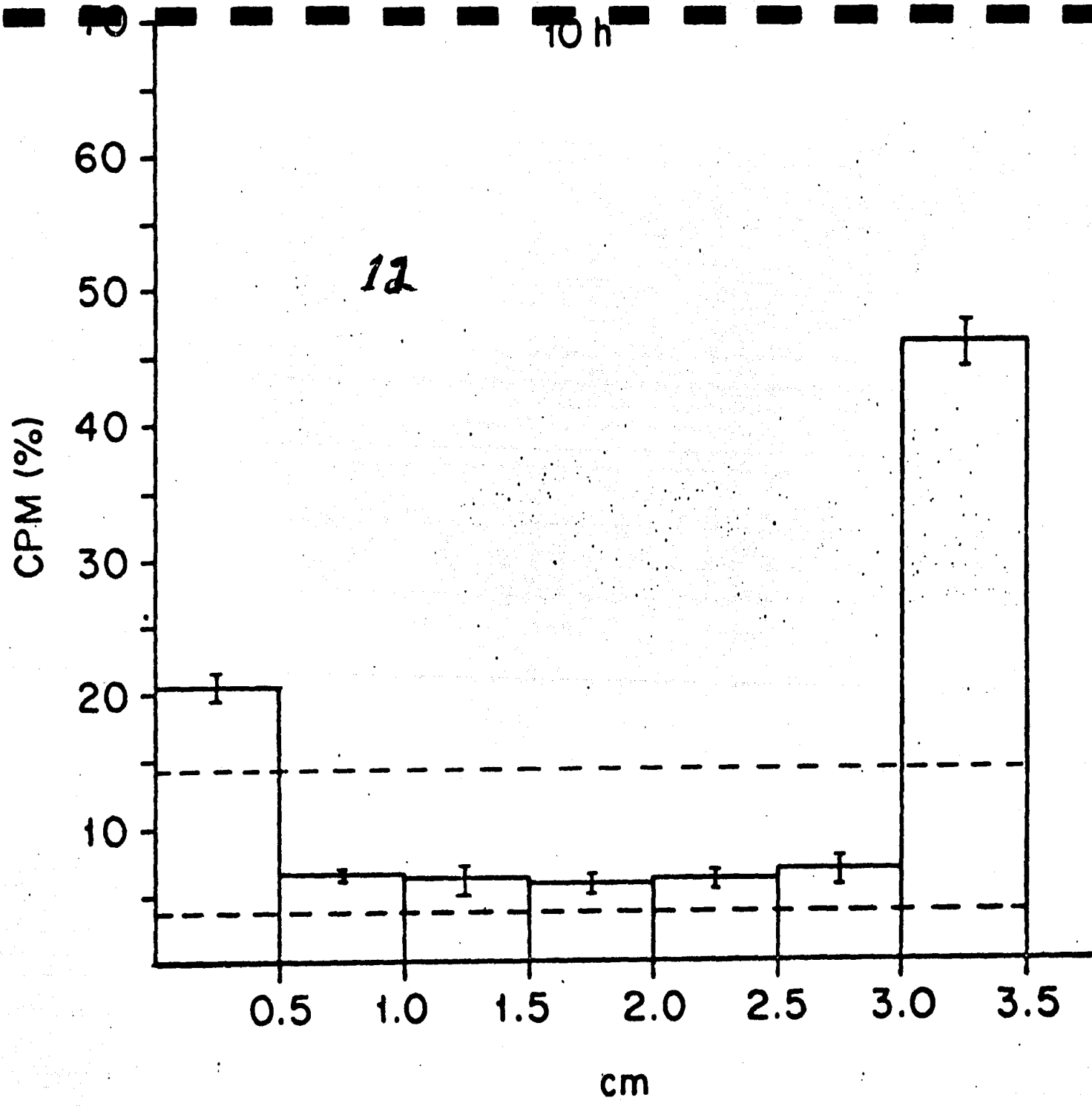
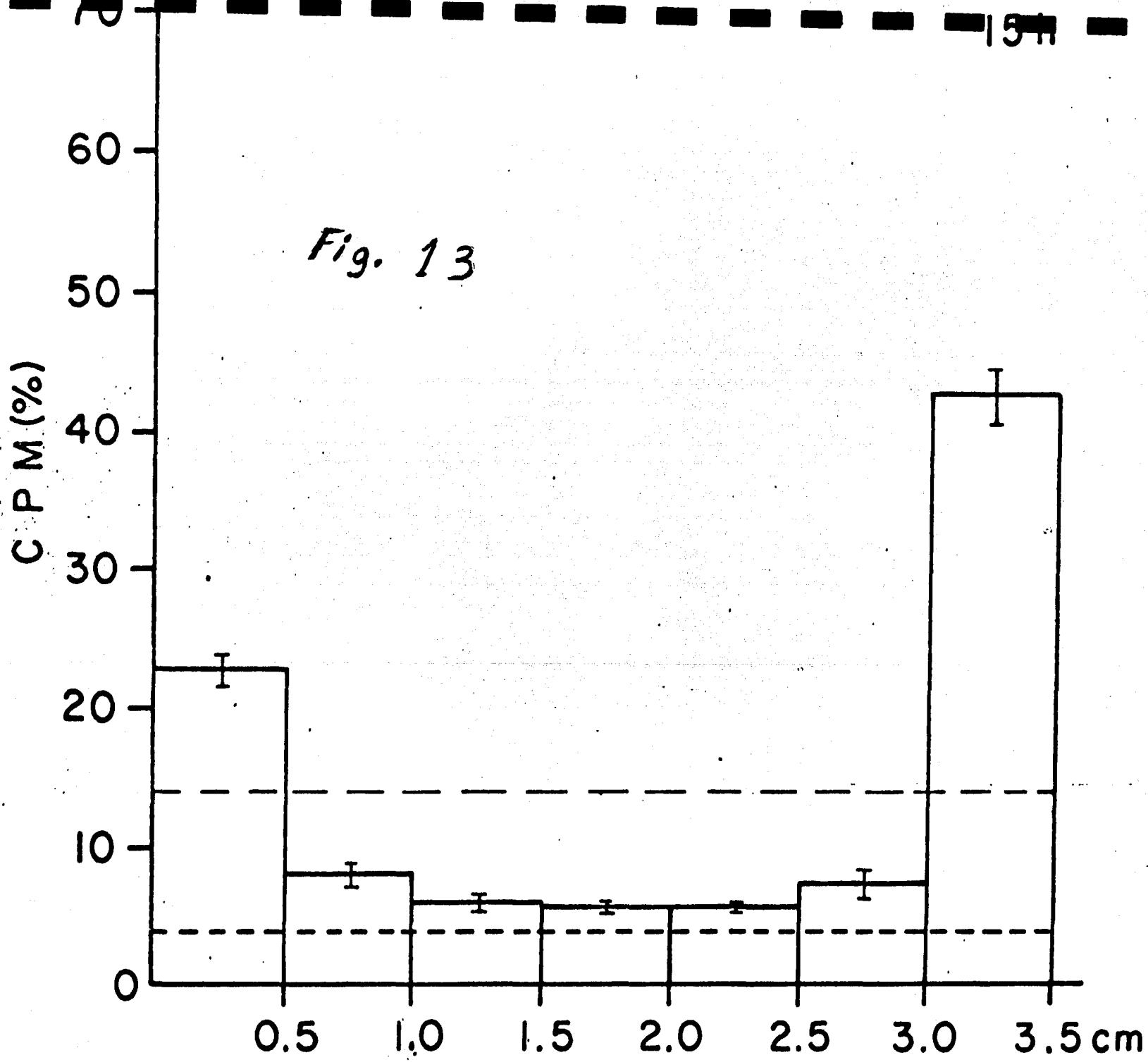


Fig. 13



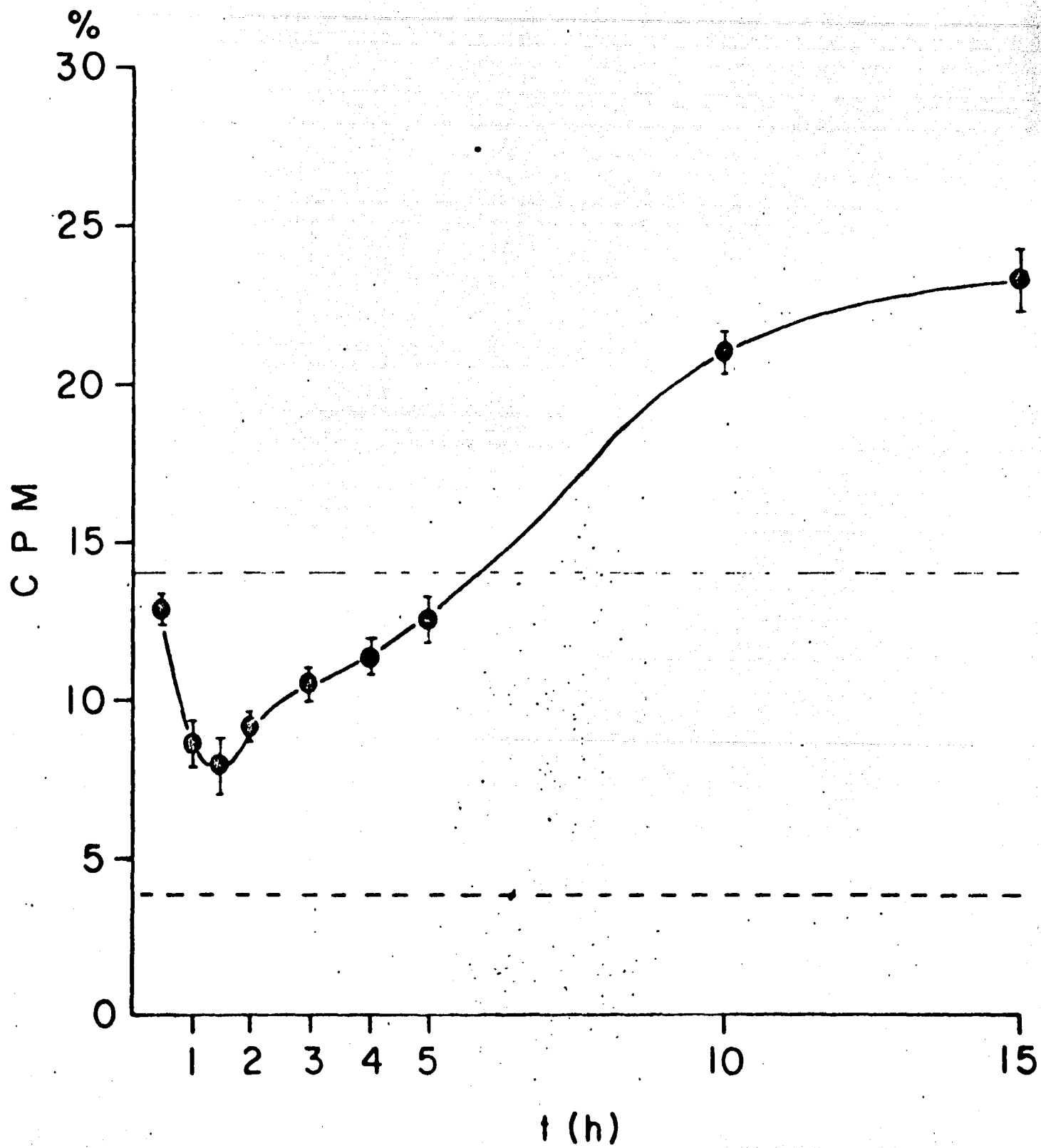


Fig. 14

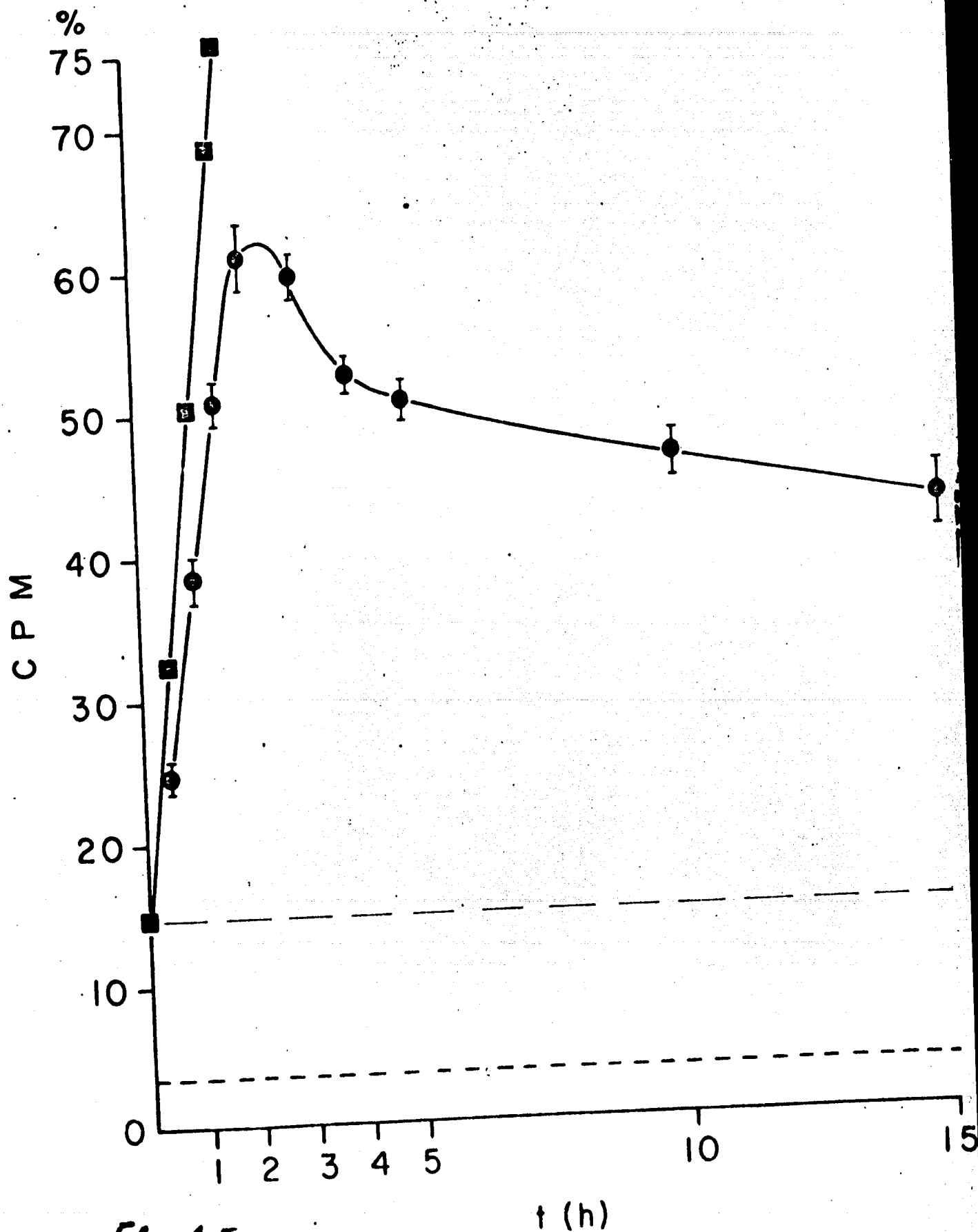


Fig 15

BIBLIOGRAFIA

1. Abbott, B. C., and Howarth, J. V. Heat studies in excitable tissues. *Physiol. Rev.* 53(1): 120 a 158, 1973.
2. Albarracin-Teulon, and Gracia-Guillen, D. Fisiologia de la ilustracion. En: P. Lain-Entralgo (Ed.), *Historia universal de la medicina*. Salvat, Mexico, 1972. p. 45 a 58.
3. Artom, C., Perrier, C., Santagelo, M., and Segre, E. Rate of organification of phosphorous in animal tissues. *Nature* 139: 836 a 837, 1937.
4. Artom, C., and Sarzana, G. Synthese des phospholipides au cours de l'absorption des graisses. *Arch. Intl. Physiol.* 45(1): 32 a 39, 1937.
5. Artom, C., and Sarzana, G. Influence des graisses alimentaires sur la formation des phospholipides dans les tissus animaux (nouvelles recherches). *Arch. Intl. Physiol.* 47(2): 245 a 276, 1938.
6. Artom, C., Sarzana, G., Perrier, C., Santagelo, M., and Segre, E. Phospholipid synthesis during fat absorption. *Nature* 139: 1105 a 1106, 1937.
7. Barondes, H. Axoplasmic transport. *Neurosc. Res. Progr. Bull.* 5(4): 1 a 1 1967.
8. Barquin, M. *Historia de la medicina-Su problematica actual.*, Mexico, 1971.
9. Bisby, M. A. Retrograde axonal transport of endogenous proteins: difference between motor and sensory axons. *J. Neurochem.* 28: 249 a 251, 1977.
10. Bisby, M. A. Functions of retrograde axonal transport. *Fed. Proc.* 41: 230 a 2311, 1982.
11. Bisby, M. A., and Buchan, H. Velocity of labelled protein undergoing anterograde an retrograde axonal transport. *Exp. Neurol.* 74: 11 a 20, 1981.
12. Bisby, M. A., and Bulger, V. T. Reversal of axonal transport at a nerve crush. *J. Neurochem.* 29: 313 a 320, 1977.
13. Bray, J. J., Kon, C. M., and Breckenridge, R. M. L. Reversed polarity of rapid transport in chicken motoneurons. *Brain Res.* 35: 313 a 564, 1971.
14. Brazier, M. A. The historical development of neurophysiology. En: J. Fie and V. E. Hall (Eds.), *Handbook of physiology*, American Physiology Society. Amer. Physiol. Soc., Washington, 1959. p. 11 a 40.
15. Burdwood, W. O. Rapid bidirectional particle movement in neurons. *J. Cel Biol.* 27: 115(a), 1965.
16. Busacchi, V. Fisiologia-La iatroquimica. En: P. Lain-Entralgo (Ed.), *Historia universal de la medicina*. Salvat, Mexico, 1972. p. 251 a 259.
17. Castaglioni, A. *A history of medicine.*, Krumbhaar, E.B., New York, 1941.
18. Causey, G., and Werner, G. Variations in the distribution of radioactivity in peripheral nerves. *Nature* 165: (#4184) 21 a 22, 1950.

19. Changus, G. W., Chaikoff, I. L., and Ruben, S. Radioactive phosphorous as an indicator of phospholipid metabolism. IV The phospholipid metabolism of the brain. *J. Biol. Chem.* 126: 493 a 500, 1938.
20. Chiewitz, O., and Hevesy, G. Radioactive indicators in the study of phosphorous metabolism in rats. *Nature* 136: 754 a 755, 1935.
21. Cid, F. Breve historia de las ciencias medicas., Espax, Barcelona, 1978.
22. Clouet, D. H., and Waelisch, H. Aminoacid and protein metabolism of the brain - VIII. The recovery of cholinesterase in the nervous system of the frog after inhibition. *J. Neurochem* 8: 201 a 215, 1961.
23. Cook, D. D., and Gerard, W. The effect of stimulation on the degeneration of a severed peripheral nerve. *Amer. J. Physiol.* 97: 412 a 425, 1931.
24. Cook, S. F., Scott, R. G., and Ahelson, P. The deposition of radio phosphorous in tissues of growing chicks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 23: 528 a 533, 1937.
25. Cuellar, R. M. Los saberes morfologicos durante el Romanticismo - La histologia y la citologia. En: F. Lain-Entralgo (Ed.), *Historia universal de la medicina.* Salvat, Mexico, 1972. p. 205 a 218.
26. Dahlstrom, A. Axoplasmic transport (with particular respect to adrenergic neurons). *Phil. Trans. Royal. Soc. London (B)* 261: 325 a 358, 1971.
27. Dahlstrom, A., and Haggendal, J. Studies on the transport and life-span of amine storage granules in a peripheral neuron system. *Acta Physiol. Scand.* 67: 278 a 288, 1966.
28. Dols, M. J. L., and Jansen, B. C. P. Phosphorous metabolism in normal, rachitic and "treated" rats. *Nature* 139: 1068, 1937.
29. Edstrom, A., and Hanson, M. Retrograde axonal transport of proteins in vitro in frog sciatic nerves. *Brain Res.* 61: 311 a 320, 1973.
30. Enteman, C., Ruben, S., Perlman, I., Lorenz, F. W., and Chaikoff, J. Radioactive phosphorous as an indicator of phosphorous metabolism. III- The conversion of phosphate to lipid P by the tissues. *J. Biol. Chem.* 124: 795 a 802, 1938.
31. Farneus, R. *Historia de la medicina.*, Gustavo Gili S.A., Barcelona, 1954.
32. Fonnum, F., Frizell, M., and Sjostrand, J. Transport, turnover and distribution of choline acetyltransferase and AChE in the vagus and hypoglossal nerves of the rabbit. *J. Neurochem.* 21: 1109 a 1120, 1973.
33. Forman, D. S., Padjen, A. L., and Siggins, G. R. Axonal transport of organelles visualized by light microscopy: cinematographic and computer analysis. *Brain Research* 136: 197 a 213, 1977.
34. Friedberg, F., Jarven, H., and Greenberg, D. M. The distribution pattern of sulfur-labelled methionine in the protein and the free amino acid fractions of tissues after intravenous administration. *J. Biol. Chem.* 173: 355 a 361,

1948.

35. Friede, R. L. Transport of oxidative enzymes in nerve fibres; a histochemical investigation of the regenerative cycle in neurones. *Exper. Neurol.* 1: 441 a 466, 1959.
36. Fries, B. A., Ruben, S., Perlman, I., and Chaikoff, I. L. Radioactive phosphorous as an indicator of phospholipid metabolism II-The role of the stomach small intestine. *J. Biol. Chem.* 123: 587 a 592, 1938.
37. Frixell, M., and Sjostrand, J. The axonal transport of slowly migrating [³H]-leucine labelled proteins and the regeneration rate in regenerating hypoglossal and vagus nerves of the rabbit. *Brain Res.* 81: 267 a 285, 1974a.
38. Frixell, M., and Sjostrand, J. Retrograde axonal transport of rapidly migrating proteins in the vagus and hypoglossal nerves of the rabbit. *J. Neurochem.* 23: 651 a 657, 1974b.
39. Fukuda, T., and Koelle, G. B. The cytological localization of intracellular neuronal AChE. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5(3): 433 a 440, 1959.
40. Garotonde, H. K., and Richter, D. The metabolic activity of the proteins of the brain. *Proc. Roy. Soc. London (B)* 145: 83 a 99, 1956.
41. Gerard, R. W. Nerve metabolism. *Physiol. Rev.* 12(4): 469 a 592, 1932.
42. Gerard, R. W. Some aspects of neural growth regeneration and function. En: P. Weiss (Ed.), *Genetic Neurology*. University of Chicago Press, Chicago, 1950.
43. Gracia-Guillen, D. (). En: P. Lain-Entralgo (Ed.), *Historia universal de la medicina*. Salvat, Mexico, 1972. p. ().
44. Grafstein, B. Transport of protein by goldfish optic nerve. *Science* 157: 196 a 197, 1967.
45. Grafstein, B. Axonal transport: the intracellular traffic of the neuron. En: S. R. Geiger and E. R. Kandel (Eds.), *Handbook of physiology. The nervous system*. Am. Physiol. Soc., Bethesda M.D., 1977. p. 691 a 711.
46. Grafstein, B., and Forman, S. Intracellular transport in neurones. *Physiol. Rev.* 60(4): 1167 a 1283, 1980.
47. Hahan, L. A., and Hevesy, G. A method for blood volume determination. *Acta. Physiol. Scand.* 1(1): 3 a 10, 1940.
48. Hahan, L. A., Hevesy, G. C., and Lunsgaard, E. C. CCXIII-The circulation of phosphorous in the body revealed by application of radioactive phosphorous as indicator. *Biochem. J.* 31: 1705 a 1709, 1937.
49. Hebb, C. O. Biochemical evidence for the neural function of ACh. *Amer. Physiol. Soc.* 37(1): 196 a 220, 1957.
50. Hebb, C. O., and Waites, H. Antero and retrograde degeneration of choline acetylase in cholinergic nerves. *J. Physiol.* 132: 667 a 671, 1956.

51. Hevesy, G. LIII- The absorption and translocation of lead by plants (A contribution to the application of radioactive indicators in the investigation of the change of substance in plants. *Biochem. J.* 17: 439 a 445, 1923.
52. Hevesy, G., and Hofer, E. Elimination of water from the human body. *Nature* 8: 879, 1934.
53. Hevesy, G., and Lunsgaard, F. Lecithinaemia following the administration of fat. *Nature* 140: 275 a 276, 1937.
54. Hyden, H. Protein metabolism in the nerve cell during growth and function. *Acta Physiol. Scand.* 6sup.17: 1 a 136, 1943.
55. Hyden, H. *The neuron.*, Elsevier Publishing Co., New York, 1967.
56. Kerkut, G. A., Shapira, A., and Walker, R. J. The transport of ¹⁴C-labelled material from CNS to muscle and vice versa along a nerve trunk. *Compar. Biochem. Physiol.* 23: 729 a 748, 1967.
57. Koening, H. The synthesis and peripheral flow of axoplasm. *Trans. Amer. Neurol. Assoc.* 8: 162 a 164, 1958.
58. Kristensson, K., Olsson, Y., and Sjostrand, J. Axonal uptake and retrograde transport of exogenous proteins in the hypoglossal nerve. *Brain Res.* 32: 399 a 406, 1971.
59. Lain-Entraigo, F. En: F. Lain-Entraigo (Ed.), *Historia universal de la medicina.* Salvat, Mexico, 1972.
60. Lain-Entraigo, F. *Historia de la medicina.*, Salvat, Mexico, 1978.
61. Lasek, R. Axoplasmic streaming in the cat dorsal root ganglia cell and the rat ventral motoneuron. *Anat. Rec.* 159: 373, 1966.
62. Lasek, R. Axoplasmic transport in cat dorsal root ganglia cells as studied with ³H-L-leucine. *Brain Res.* 7: 360 a 377, 1968.
63. Lasek, R. J. Bidirectional transport of radioactively labelled axoplasmic components. *Nature* 216: 1212 a 1214, 1967.
64. Lasek, R. J. Protein transport in neurons. *Intl. Rev. Neurobiol.* 13: 289 a 324, 1970.
65. Lasso-de-la-Vega, J. S. Pensamiento presocratico y medicina. En: F. Lain-Entraigo (Ed.), *Historia universal de la medicina.* Salvat, Mexico, 1972. p. 37 a 61.
66. Lewis, G. N. The biology of heavy water. *Science* 79#2042: 151 a 153, 1934.
67. Lopez-Pinero, J. M. La iatroquimica. En: F. Lain-Entraigo (Ed.), *Historia universal de la medicina.* Salvat, Mexico, 1972. p. 279 a 292.
68. Lotfield, R. B., and Harris, A. Participation of free amino acids in protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 219: 151 a 159, 1956.

69. Lubinska, L. Axoplasmic streaming in regenerating and normal nerve fibres. En: M. Singer and J. Schade (Eds.), *Progress in brain research. Mechanisms of neural regeneration.* Elsevier, Amsterdam, 1964. p. 1 a 66.
70. Lubinska, L., and Niemierko, S. Velocity and intensity of bidirectional migration of AChE in transected nerves. *Brain Res.* 27: 329 a 342, 1971.
71. Lubinska, L., Niemierko, S., and Oderfeld, B. Bidirectional movement of axoplasm in nervous fibres. *Acta Biologica Experimental (Warsaw)* 23(4): 239 a 247, 1963.
72. Mc-Ewen, B. S., and Grafstein, B. Rapid transport of labelled material in fish optic nerve. En: Z. Ladin (Ed.), *Intl. Symp. Metabol. of nuclear acids and proteins and the function of the neuron.* Excerpta Med. Found., Amsterdam, 1967. p. 246 a 255.
73. Miani, N. Analysis of the somato-axonal movement of phospholipids in the vagus and hypoglossal nerves. *J. Neurochem.* 10: 859 a 874, 1963.
74. Miani, N. Proximo-distal movement of phospholipid in the axoplasm of the intact and regenerating neurons. En: M. Singer and S. D. Schade (Eds.), *Progress in brain research. Mechanism of neural regeneration.* Elsevier, Amsterdam, 1964. p. 115 a 126.
75. Miani, N., Rizzoli, A., and Bucciante, G. Metabolic and chemical changes in regenerating neurons. II- In vitro rate of incorporation of amino acids into protein of the ganglion of rabbit. *J. Neurochem.* 7: 161 a 173, 1961.
76. Munoz-Martinez, E. J., Nunez, R., and Sanderson, A. Axonal transport: a quantitative study of retained and transported protein fraction in the cat. *J. Neurobiol.* 12(1): 15 a 26, 1981.
77. Nakai, J. Dissociated dorsal root ganglia in tissue culture. *Amer. J. Anat.* 99: 81 a 99, 1956.
78. O'Malley, C. D. Los saberes morfologicos en el renacimiento. En: P. Lain-Entralgo (Ed.), *Historia universal de la medicina.* Salvat, Mexico, 1972. p. 43 a 76.
79. Ochs, J., Sabri, M. I., and Johnson, J. Fast transport system of materials in mammalian nerve fibres. *Science* 163: 686 a 687, 1969.
80. Ochs, S. Axoplasmic flow in neurons. En: J. Gaito (Ed.), *Macromolecules and behaviour.* Appleton-Century-Crofts, New York, 1966.
81. Ochs, S. Characteristics and a model for fast axoplasmic transport in nerve. *J. Neurobiol.* 2(4): 331 a 345, 1971.
82. Ochs, S. Retention and redistribution of proteins in mammalian nerve fibres by axoplasmic transport. *J. Physiol.* 253: 459 a 475, 1975.
83. Ochs, S. *Axoplasmic transport and its relation to other nerve functions.*, Wiley Interscience, New York, 1982a.
84. Ochs, S. Fast axoplasmic transport in mammalian nerve. *Federat. Proc.* 41(7): 2300, 1982b.

85. Ochs, S. Calcium and the mechanism of axoplasmic transport. *Federat. Proc.* 41(7): 2301 a 2306, 1982c.
86. Ochs, S., and Bulger, E. Movement of substance proximo-distally in nerve axons as studied with spinal cord injections of radioactive phosphorous. *Amer. J. Physiol.* 194: 499 a 506, 1958.
87. Ochs, S., Dalrymple, D., and Richards, G. Axoplasmic flow in ventral root nerve fibres of the cat. *Exper. J.* 5: 349 a 363, 1962.
88. Ochs, S., Johnson, J., and Kidwai, A. M. Fast and slow phases of axoplasmic transport in motoneuron axons. *Federat. Proc.* 27: 235, 1968.
89. Ochs, S., Johnson, J., and Ng, M. H. Protein incorporation and axoplasmic flow in motoneuron fibres following intra cord injection of labelled leucine. *J. Neurochem.* 14: 317 a 331, 1967.
90. Ochs, S., and Ranish, N. Characteristics of the fast transport system in mammalian nerve fibres. *J. Neurobiol.* 1: 247 a 261, 1969.
91. Ochs, S., Sabri, M. I., and Ranish, N. Somal site of synthesis of fast transported materials in mammalian nerve fibres. *J. Neurobiol.* 1(3): 329 a 344, 1970.
92. Ochs, S., and Smith, C. Low temperature slowing and cold-block of fast axoplasmic transport in mammalian nerves in vitro. *J. Neurobiol.* 6(1): 85 a 109, 1975.
93. Papp, G. Sinopsis de la ciencia positivista. En: F. Lain-Entralgo (Ed.), *Historia universal de la medicina.* Salvat, Mexico, 1972. p. 11 a 23.
94. Parker, G. H. What are neurofibrils? *Amer. Nat.* 53(685): 97 a 117, 1929a.
95. Parker, G. H. The neurofibril hypothesis. *Quart. Rev. Biol.* IV(2): 155 a 179, 1929b.
96. Parker, G. H. On the trophic impulse so-called, its rate and nature. *Amer. Natur.* 66(703): 147 a 158, 1932.
97. Perlman, I., Ruben, S., and Chaikof, I. L. Radioactive phosphorous as an indicator of phospholipid metabolism I-The rate of formation and distribution of phosphorous in the fasting rat. *J. Biol. Chem.* 122: 169 a 183, 1937-38.
98. Pomerat, C. M., Hendelman, W. J., Raiborn, C. W., and Massey, J. F. Dynamic activities of nervous tissue in vitro. En: H. Hyden (Ed.), *The Neuron.* Elsevier, Amsterdam, 1967. p. 119 a 178.
99. Poynter, F. The brain and its functions -The history and philosophy of knowledge of the brain and its functions., Ch. C. Thomas, Illinois, 1957.
100. Ramon y Cajal, S. *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres.*, Maloine, A., Paris, 1909.
101. Ranvier, M. L. Structure et physiologie des nerfs peripheriques. *Compt. Rend. des Sean. et Memoir. de la Soc. de Biol.* : 130 a 134, 1871.

102. Riviere, J. La medicina de la antigua India. En: P. Lain-Entralgo (Ed.), Historia universal de la medicina. Salvat, Mexico, 1972. p. 129 a 154.
103. Sachs, H. Vasopresin Biosynthesis I-In vivo studies. J. Neurochem. 5: 297 a 303, 1960.
104. Samuels, A. J., Boyarsky, L. L., Gerard, R. W., Libet, B., and Brust, M. Distribution, exchange and migration of phosphate compounds in the nervous system. Amer. J. Physiol. 164(1): 1-15, 1951.
105. Singer, C. The scientific views and vision of Saint Hildegard (1098-1180) y A study in early renaissance anatomy, with a new text: the ANATOMIA of Hieronymo Manfredi. Transcribed and translated by Hildred Westland. En: C. Singer (Ed.), Studies on the history and method of science. Clarendon Press, Londres, 1955. p. 1 a 164.
106. Sjostrand, J., and Frizell, M. Retrograde axonal transport of rapidly migrating proteins in peripheral nerves. Brain Res. 85: 325 a 330, 1975.
107. Smith, R. S. The short term accumulation of axonally transported organelles in the region of localized lesions of single myelinated axons. J. Neurocytol. 9: 39 a 65, 1980.
108. Snyder, R. E. The kinetics of turnover and retrograde axonal transport. J. Neurobiol. 17(6): 637 a 647, 1986.
109. Takahashi, Y., Nomura, M., and Furusawa, S. In vitro incorporation of ^{14}C -amino acids into proteins of peripheral nerve during wallerian degeneration. J. Neurochem. 7: 97 a 102, 1961.
110. Takenaka, T. Particle movement in axoplasmic transport. En: Z. Iqbal (Ed.) Axoplasmic transport. CRS Press Inc., Florida, 1986. p. 110 a 117.
111. Taton, R. A. General history of science - from prehistory to A.D. 1450., Thames & Hudson, London, 1963.
112. Verne, J., and Droz, B. Deplacement de la radioactivite dans le ganglion cervical superieur apres injection de ^{35}S -methionine. Experientia 16: 77 a 78, 1960.
113. Von-Euler, U. S. The presence of adrenergic neurotransmitter in intraaxonal structures. Acta Physiol. Scand. 43: 155 a 166, 1958.
114. Waelsch, H. M. D. Some aspects of amino acid and protein metabolism of the nervous system. J. Nerv. Ment. Dis. 126(1): 33 a 39, 1958.
115. Waller, M. Some memoire sur le systeme nerveaux. Comptes. Rend. Hebdom. de l'Acad. 35: 561 a 564, 1852.
116. Weiss, D. G. The mechanism of axoplasmic transport. En: Z. Iqbal (Ed.), Axoplasmic transport. CRS Press Inc., Florida, 1986. p. 276 a 296.
117. Weiss, P., and Hiscoe, C. Experiments on the mechanism of nerve growth. J. Exper. Zool. 107(3): 315 a 395, 1948.

118. Weiss, P., and Holland, Y. Neuronal dynamics and axonal flow. II The olfactory nerve as model test object. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 57: 258 a 264, 1967.
119. Weiss, P., Wang, H., Taylor, A. C., and Edds, M. V. Proximo-distal fluid convection in the endoneurial spaces of peripheral nerves demonstrated by colored and radioactive (isotope) tracers. *Amer. J. Physiol.* 143: 521 a 540, 1944.
120. Wilson, L. G. Erasistratus, Galen and de pneuma. *Bull. Hist. Med.* 33(4): 293 a 314, 1959.
121. Young, J. Z. The functional recovery of nervous tissue. *Physiol. Rev.* 22(4): 318 a 374, 1942.
122. Young, J. Z. Contraction, turgor and the cytoesqueleton of the nervous fibres. *Nature* 153: 333 a 335, 1944.