

Mf- 262 268

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

(B)



ACIDO  $\gamma$  AMINO BUTIRICO Y SINTESIS DE PROTEINAS

EN PARTICULAS SUBCELULARES DE CEREBRO DE RATON

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA : BLANCA ESTHER TREVIÑO VAZQUEZ.

1 9 7 3

M-172551



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ  
VOCAL: EDMUNDO CHAVEZ COSIO  
SECRETARIO: RICARDO TAPIA  
1er. SUPLENTE: ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN  
2o. SUPLENTE: IRMA KORKOWSKI PLESS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNAM

SUSTENTANTE:

BLANCA ESTHER TREVIÑO VAZQUEZ

ASESOR DEL TEMA:

RICARDO TAPIA I.

Faint, illegible text in the top right corner, possibly a header or page number.



## I N D I C E

### INTRODUCCION

Comunicación Interneuronal: Sinapsis-----	1
Síntesis de Proteínas en el Sistema Nervioso Central-----	4
Posible Relación Transmisores Sinápticos-Síntesis de Proteínas-----	9

### MATERIALES Y METODOS

Separación de fracciones subcelulares en un gra- diente continuo y precipitación de proteínas-----	13
Marcadores enzimáticos-----	15
Microscopía Electrónica-----	16
Preparación de la Bentonita para la obtención de ribosomas-----	17
Aislamiento de ribosomas-----	17

RESULTADOS-----	21
-----------------	----

DISCUSION-----	41
----------------	----

CONCLUSIONES-----	48
-------------------	----

BIBLIOGRAFIA-----	49
-------------------	----

## I N T R O D U C C I O N

El estudio de los mecanismos moleculares del funcionamiento del Sistema Nervioso Central puede enfocarse, entre otros, a dos niveles generales: metabolitos de bajo peso molecular que posiblemente participan en los fenómenos de transmisión del impulso eléctrico, y metabolismo de macromoléculas (proteínas). En las siguientes secciones se revisarán los datos más pertinentes en relación con el objetivo general del presente trabajo de tesis, que es el aportar nuevos datos que permitan un mejor entendimiento de la posible relación fisiológica entre ambos niveles.

Comunicación Interneuronal: Sinapsis.- El Sistema Nervioso Central (SNC) presenta características funcionales y estructurales muy importantes para el organismo; una de ellas, tal vez la más interesante, es la comunicación que existe entre todos sus elementos.

La comunicación entre las células nerviosas se establece por medio de impulsos que se transmiten de una neurona a otra a través de sitios especializados llamados "Sinapsis". Numerosos estudios realizados han permitido establecer la existencia de dos tipos de sinapsis: Eléctrica y Química.

En la sinapsis eléctrica, la transmisión del impulso nervioso se lleva a cabo de una manera similar al paso de corriente entre dos conductores eléctricos, ya que las membranas presináptica y postsináptica están en contacto directo una con la otra. En cambio,

Los transmisores utilizados por el sistema nervioso central de los mamíferos permanecen en su mayoría aún no identificados, aunque algunos como la Acetilcolina y el Acido Glutámico parecen tener un papel como transmisores excitadores, mientras que la Glicina parece ser un transmisor inhibidor en la médula espinal (2).

En los crustáceos se ha demostrado que el transmisor que actúa en las terminaciones neuromusculares inhibitorias es el Acido gamma amino butírico (GABA) (3). En el SNC de los mamíferos el GABA se encuentra en relativa abundancia y fuera del tejido nervioso sólo está presente en pequeñas cantidades en el riñón (4). Durante los últimos años se han acumulado evidencias que apoyan el punto de vista de que el GABA funciona como transmisor inhibidor a nivel de SNC en mamíferos (3). Su síntesis se lleva a cabo exclusivamente en el SNC a partir del Acido Glutámico, que se descarboxila irreversiblemente por la Glutamato Descarboxilasa (GAD) (5). La GAD es una enzima que se encuentra casi exclusivamente en SNC y requiere fosfato de piridoxal como coenzima. La principal vía de degradación del GABA es por transaminación con alfa ceto glutarato para formar Glutamato y semialdehído succínico; la transaminasa que aquí interviene también requiere fosfato de piridoxal como cofactor.

Síntesis de Proteínas en el Sistema Nervioso Central.- Recientemente los conceptos acerca de la naturaleza y regulación de los procesos involucrados en la Síntesis de Proteínas del Sistema Nervioso han tenido modificaciones muy importantes. Parece ser que los mecanismos básicos de la síntesis de proteínas son los mismos que en todas las células. Sin embargo, observado detalladamente la información sobre aspectos comparativos de este proceso en diversas células de organismos, surgen diferencias bastante importantes. Estas diferencias parecen derivarse de las adaptaciones selectivas que una célula sufre de acuerdo a la evolución y a requerimientos en el organismo para desempeñar una función específica.

Se ha reportado que existen variaciones en la actividad de la síntesis de proteínas en el cerebro durante el desarrollo. Dicha síntesis es más activa en animales jóvenes que en adultos. En experimentos hechos en corteza cerebral se ha observado que el mayor decremento en síntesis de proteínas ocurre inmediatamente después del nacimiento y es seguido de una declinación gradual a medida que va aumentando la edad del animal (6).

Se han descrito varias fracciones subcelulares que presentan actividad en síntesis de proteínas en el SNC: mitocondrias de neuronas y glia, terminaciones nerviosas (sinaptosomas), sistemas nucleares que contienen RNA, membranas axonales y Ribosomas(7).



Las evidencias existentes de la presencia de síntesis de proteínas mitocondrial en SNC, se basaban inicialmente en la observación de ciertas enzimas cerebrales y de otras proteínas, que se encuentran más concentradas en mitocondrias aisladas, que en otras fracciones subcelulares. Aunque esta localización podía explicarse por transporte proveniente de los microsomas o por contaminación durante el aislamiento, desde hace algunos años se ha demostrado que las mitocondrias cerebrales contienen DNA, RNA, aminoacil RNA sintetasa y RNA sintetasa dependiente de DNA (8) que son componentes requeridos para la síntesis de proteínas. Probablemente por esta razón las mitocondrias cerebrales presentan una gran actividad de incorporación de aminoácidos marcados a proteínas, tanto "in vivo" como "in vitro". Se ha observado que los sistemas mitocondriales de síntesis de proteínas en rata no tienen requerimientos de enzimas pH 5 o de ATP exógeno (9).

Las terminaciones nerviosas aisladas o sinaptosomas, presentan también capacidad de incorporar aminoácidos marcados a proteínas en condiciones apropiadas "in vitro"; existen datos obtenidos por análisis autorradiográficos (10) que establecen definitivamente que dichas estructuras tienen esta capacidad, además de que en esta fracción existe un alto nivel de RNA (11). En estudios hechos en sistemas libres de células en rata, se ha demostrado que el sistema sinaptosomal de síntesis de proteínas no requiere de ATP ni de ningún sis-

tema generador de energía; aún más, el ATP agregado tiene efecto inhibitorio a cualquier concentración, en contraste con el sistema mitocondrial en el que el ATP no tiene ningún efecto. Ambos sistemas no se afectan cuando se ensayan en presencia de ribonucleasa, lo cual sugiere que las fracciones no están contaminadas con ribosomas citoplasmáticos y que dicha enzima no puede atravesar las membranas sinaptosomal y mitocondrial (11). Los dos sistemas se ven afectados cuando se agregan a ellos inhibidores de la fosforilación oxidativa, lo cual sugiere que la síntesis de proteínas sinaptosomal depende de la energía producida por mitocondrias sinaptosomales.

Se han reportado muchos datos <sup>8,</sup> (11, 12, 13, 14) acerca de la inhibición causada en estos sistemas por la adición de antibióticos, observándose que afectan a los sistemas de síntesis de proteínas mitocondrial, sinaptosomal y ribosomal de diferente manera, lo cual puede darnos una idea de las variaciones existentes entre dichos sistemas. Por ejemplo, el cloramfenicol inhibe a la síntesis de proteínas en mitocondrias, mientras que la cicloheximida la inhibe en sinaptosomas (8) y la puromicina afecta tanto al sistema mitocondrial como al ribosomal (14).

Investigaciones recientes apoyan el concepto de que también en el núcleo hay síntesis de proteínas; se ha demostrado que ~~existen ribosomas en núcleo purificados de tejido de mamíferos,~~

preparaciones hepáticas; más aún, las enzimas pH 5 hepáticas son menos efectivas con ribosomas cerebrales que la preparación pH 5 cerebral (16). Sistemas análogos de otras fuentes presentan generalmente una máxima actividad de incorporación de aminoácidos en presencia de bajos niveles de iones y son menos sensibles a alteraciones relativamente pequeñas de estos niveles (7).

#### Posible Relación Transmisores Sinápticos-Síntesis de Proteínas.-En

los últimos años un gran número de observaciones morfológicas y bioquímicas han sugerido un papel importante para las proteínas en la función sináptica. Al mismo tiempo han surgido una serie de evidencias que apoyan la idea de que algunos neurotransmisores pueden estar involucrados en la regulación de la síntesis de proteínas; por ejemplo, la glándula parótida estimula su síntesis de proteínas por la adición de epinefrina (17); y la incorporación de triptofano marcado a proteínas en cultivos de tejido de la glándula pineal es estimulado por norepinefrina (18).

Por otro lado, Tewari y Baxter (19) trabajando en sistemas de síntesis de proteínas con ribosomas aislados de cerebro de rata, encontraron que de más de 20 aminoácidos que fueron probados en concentraciones fisiológicas en el sistema, solamente dos aminoácidos postulados como neurotransmisores, la Glicina y el GABA, estimularon claramente la incorporación a proteínas de leucina, lisina

gradiente se guarda en el refrigerador hasta su uso.

Una vez colocada la muestra sobre el gradiente frio, se centrifugó a 37,000 x g en el rotor SW 50 de la centrífuga Spinco durante 120 minutos. Se obtuvieron fracciones de 0.5 ml del gradiente utilizando una pipeta Pasteur. Todas las operaciones se realizaron a 0-4°C, las fracciones iguales de cada tubo se reunieron. Este procedimiento está basado en el método descrito por <sup>Snyder</sup> ~~LIVERSEN~~ y (37). De cada fracción se tomaron 0.05 ml para determinación de proteína total y el resto se precipitó con Acido Tricloroacético (TCA) al 10% conteniendo l-leucina 0.5%. El precipitado se lavó una vez con la misma solución. El sobrenadante del lavado se agrega al primero y se guarda (en adelante se le llamará fracción TCA soluble) y el precipitado se lavó con 1 ml de TCA al 10% y se calentó en un baño de agua en ebullición durante 20 minutos, para destruir los aminoacil tRNA (16), se lavó 3 veces con etanol-eter 3:1 para extraer el TCA y se disolvió una alícuota de 0.2 ml en NCS para solubilizar; se añadió 10 ml del líquido de centelleo descrito por Johnson (26) que contiene: 180 ml de tolueno, 180 ml de dioxano, 108.2 ml de etanol, 2.5 g de PPO, 25 mg de POPOP y 41.6 g de naftaleno para 500 ml de líquido. A 0.3 ml de la fracción TCA soluble se añadió 10 ml del mismo líquido, la radiactividad se contó en un Contador de centelleo Nuclear Chicago. La eficiencia del sistema fue de 56% (standard interno) tanto para TCA soluble como para la proteína.

Para verificar la pureza de las fracciones subcelulares obtenidas en el gradiente se utilizaron marcadores enzimáticos (Deshidrogenasa succínica y láctica y acetilcolinesterasa) y

Las fracciones pH 5 y ribosomal se resuspendieron suavemente en medio M, y se tomó una alícuota de 0.05 ml para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry (32). Una vez calculado el volumen en el que se encuentra la cantidad de proteína deseada, se preparó el sistema de incubación para la síntesis de proteínas. Se usaron dos sistemas diferentes que tienen la composición indicada en la tabla 1.

Los componentes se agregaron en el orden en que se presentan en la tabla 1. La reacción se detuvo a los diferentes tiempos ensayados agregando 2 ml de TCA 7.5% conteniendo leucina al 1%. Para obtener las proteínas, se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm, el precipitado se disolvió en 0.5 ml de leucina 0.2 M en NaOH 0.25 M y se agregó 2 ml de TCA al 5%. Se lavó el precipitado con 2 ml de TCA al 5% y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos. Se centrifugó y el precipitado se colocó de nuevo en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos. Se centrifugó y lavó el precipitado 2 veces con una mezcla etanol-éter 3:1. Se secó el precipitado en baño de agua hirviendo, y se disolvió en 0.4 ml de NaCl 0.15 N, agregando 5 a 8 gotas de NaOH 1N. Se tomó una alícuota de 0.05 ml para determinar la cantidad de proteína presente, por el método de Lowry (32). La radioactividad de una alícuota de 0.2 ml se contó como se ha indicado anteriormente, después de añadir 10 ml del líquido de centelleo de Johnson (26) descrito antes.

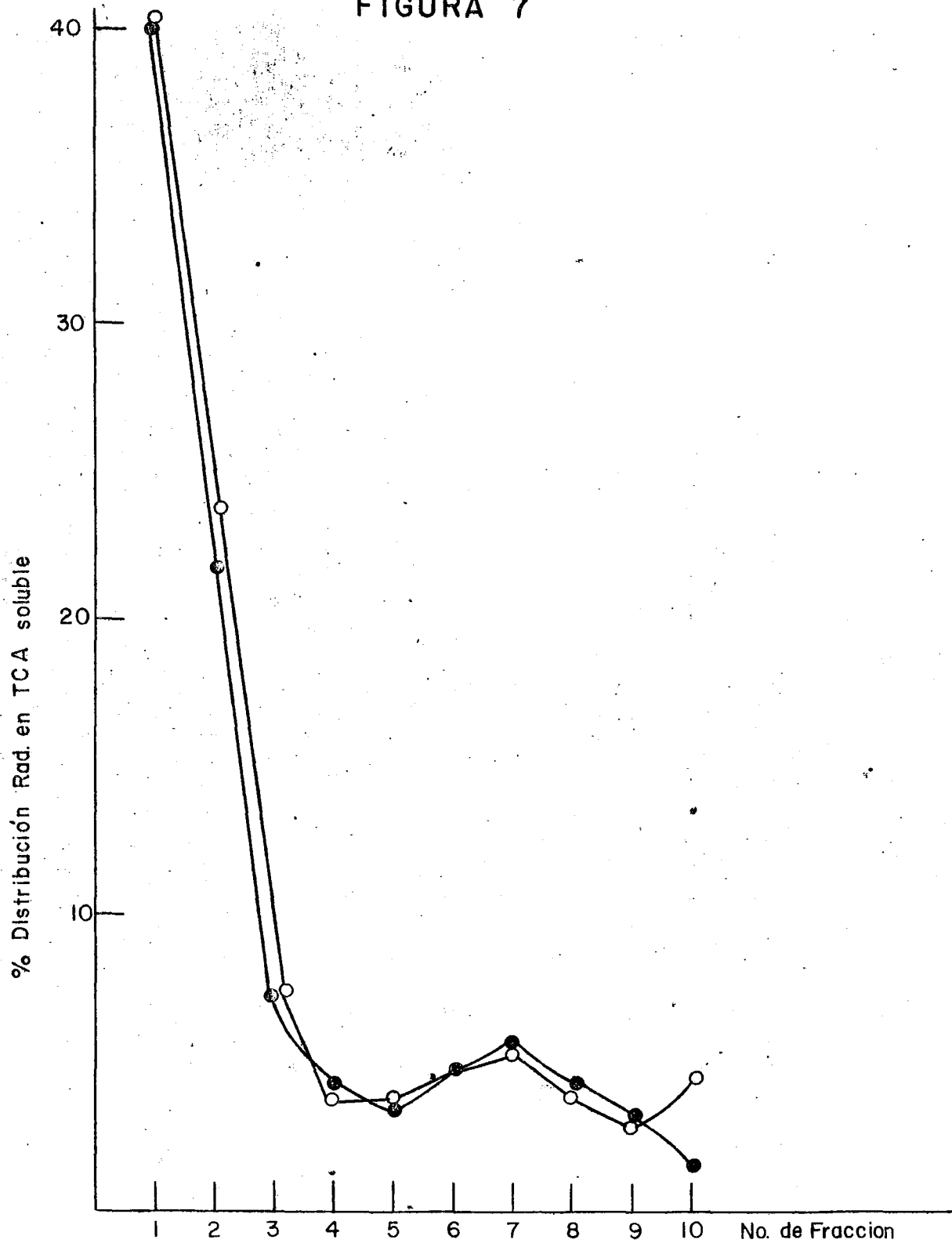
## RESULTADOS

Para observar la distribución de las fracciones subcelulares en el gradiente continuo, se midió la actividad de enzimas que por ser características de una determinada estructura subcelular, pueden servir como marcadores de ellas en el gradiente. La deshidrogenasa succínica (DHS) es una enzima característica de mitocondrias, la deshidrogenasa láctica (DHL) marca la presencia de fracción soluble celular y la acetilcolinesterasa (Ache) se encuentra en estructuras membranales, inclusive la membrana sinaptosomal.

En la figura (2) se muestra la distribución de estas enzimas en el gradiente. Puede verse que en las fracciones 1 y 2 la DHS y la Ache se encuentran en muy baja concentración, mientras que la DHL se encuentra sumamente elevada. En las fracciones 3, 4 y 5 la DHS y la DHL se encuentran en mucho menor cantidad y la Ache tiene aquí una concentración más elevada. La DHL y DHS en las fracciones 6 y 7 se encuentran en concentraciones aún menores, en tanto que la Ache alcanza aquí su máximo nivel. Las fracciones 8, 9 y 10 presentan una concentración de DHS muy elevada, aunque la Ache también se encuentra aquí aumentada probablemente por contaminación. En estas fracciones la actividad de DHL es muy pequeña.

Además de los marcadores enzimáticos, se hizo un control morfológico de la pureza de las fracciones del gradiente. En las

FIGURA 7



Efecto del tratamiento con FPGAH sobre la distribución de radioactividad soluble en TCA en las fracciones subcelulares separadas en un gradiente continuo de Sacarosa 0.32 - 1.5 M. Se presentan los promedios  $\pm$  E.E. de 6-8 datos.

lar ribosomas de animales tratados con FPGAH y controles para ensayar un sistema de síntesis de proteínas libre de células "in vitro".

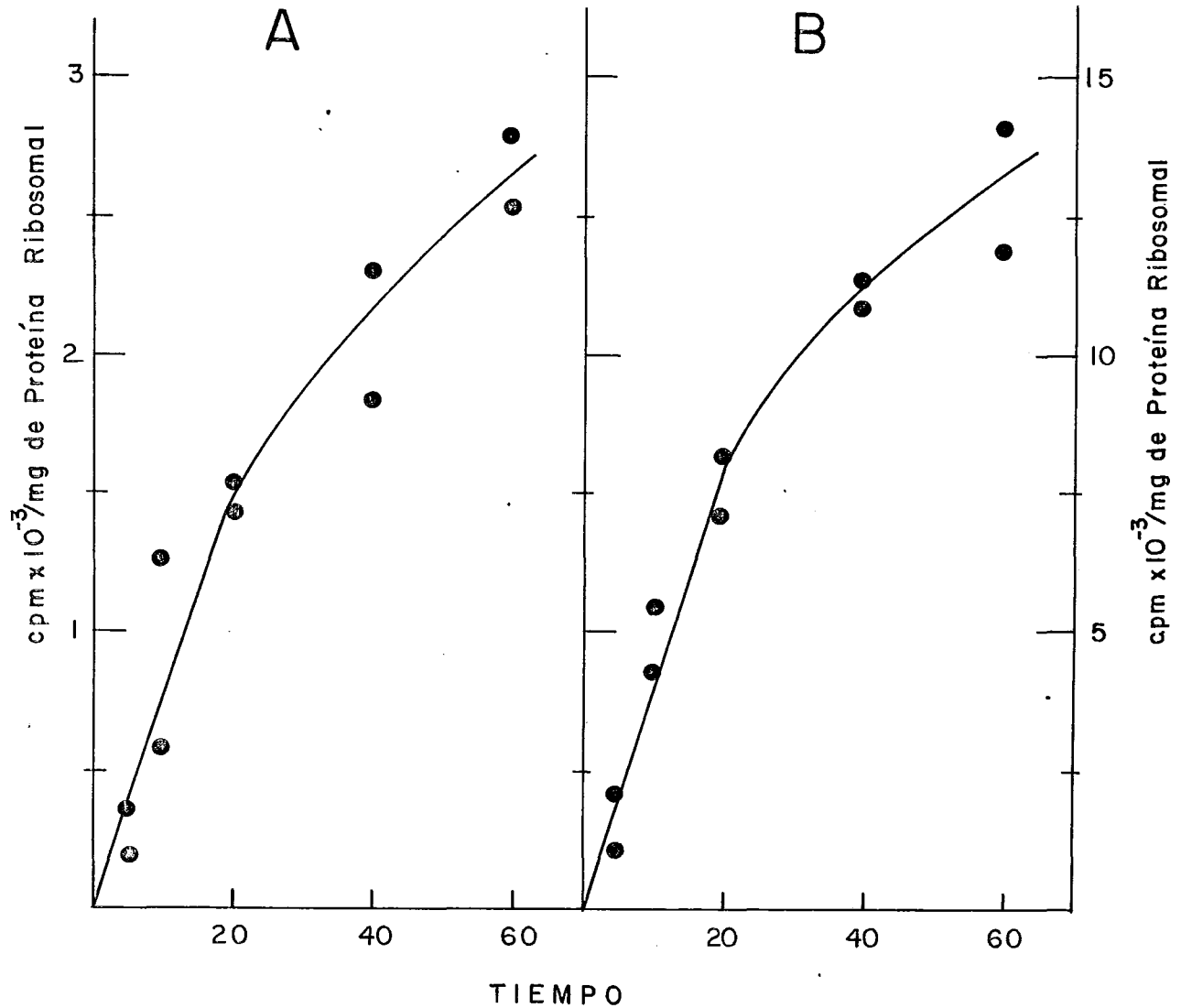
Al iniciar los ensayos de la técnica para la separación de ribosomas y fracción pH 5 y el acoplamiento de dichas fracciones en un sistema de síntesis de proteínas, se observó que no había incorporación de leucina marcada a proteínas. Como esto podría deberse a la acción de la ribonucleasa presente, se pensó en agregar al sistema un inhibidor de dicha enzima, encontrando a la Bentonita como el más adecuado (31). En la tabla II se muestra el efecto de la Bentonita añadida en diferentes pasos de la separación de los ribosomas y la fracción pH 5, observándose que su actividad como inhibidor de la ribonucleasa es óptima cuando se agrega al tejido antes de homogeneizar tanto si se toma en cuenta el rendimiento de la proteína total en ambas fracciones, como si se considera la linealidad de la incorporación de leucina marcada a proteínas durante 60 minutos.

El procedimiento para la separación de las partículas ribosomales y fracción pH 5 y la incubación para la síntesis de proteínas, se hizo en todos los casos en el mismo día, ya que manteniendo congeladas las fracciones PH 5 y ribosomal y montando el sistema de incubación al día siguiente, se pierde aproximadamente el 50% de la actividad.

Para el ensayo de la incorporación de leucina <sup>14</sup>C a proteí-



FIGURA 9



Actividad de incorporación de leucina  $^{14}\text{C}$  a proteínas en un sistema ribosomal "in vitro" con el medio de Incubación de Tewari y Baxter (TABLA I).

Las figuras representan dos experimentos efectuados por duplicado en diferente día.

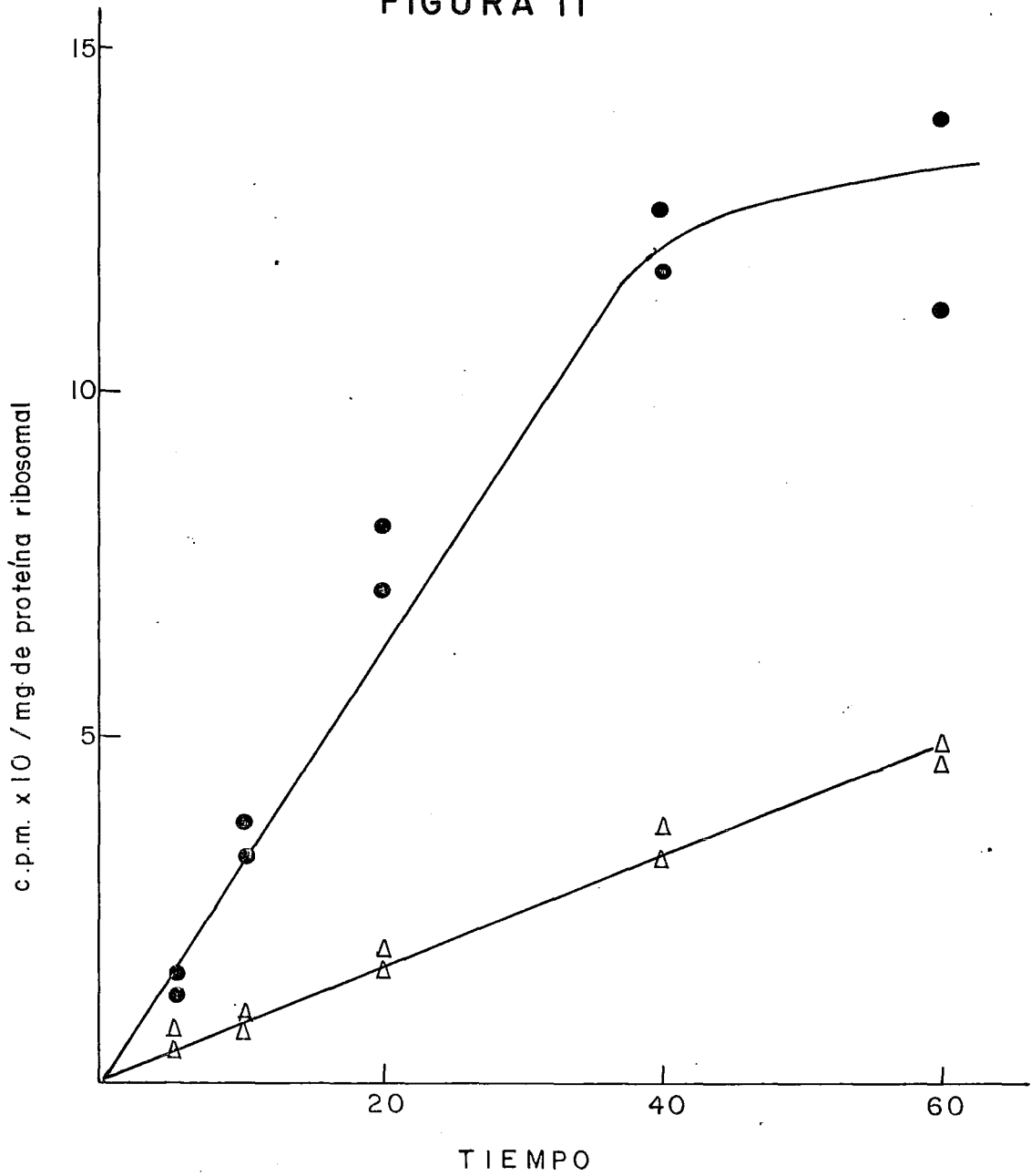
Nótese el cambio de escala en los ordenados en A y B

cerebros en ambas mezclas de incubación, se observó que la actividad del sistema de Campbell es menor que en el de Tewari, aunque la linealidad del primero se mantiene durante más tiempo fig. (1/). En función de todos los datos anteriores los siguientes experimentos se llevaron a cabo con el sistema de Campbell.

Para observar el efecto que tiene sobre la síntesis de proteínas ribosomal la disminución de los niveles de GABA "in vivo", se administró a los ratones FPGAH. Después de 29 minutos se procedió a aislar los ribosomal y la fracción pH 5 tanto del cerebro de animales tratados como de animales a los que se inyectó NaCl 0.9%. Los resultados de la incorporación de leucina <sup>14</sup>C a proteínas en ambos grupos se muestran en la fig. (12), donde puede observarse una inhibición de 12, 23 y 24% a los 20, 40 y 60 minutos de incubación respectivamente, en la actividad del sistema obtenido de los animales tratados, respecto al valor control. No se observó inhibición a los 10 minutos de incubación.

En un intento de establecer si la diferencia observada entre controles y tratados se debía realmente a la administración de FPGAH o a la falta de reproducibilidad del sistema, ya que la inhibición observada no fue muy grande y no fué constante en el tiempo, se obtuvieron separadamente ribosomas y fracción pH5 del cerebro de dos grupos de ratones tratados ambos con NaCl 0.9% el mismo día y se midió la síntesis de proteínas "in vitro" con las fracciones

FIGURA II



Incorporación de leucina a  $^{14}\text{C}$  a proteínas en un sistema ribosomal "in vitro".

● Indican duplicados hechos en el sistema de incubación según Tewari y Baxter (Tabla I).

○ Representan duplicados con el sistema de incubación de Cambell et al (TABLA), ambos sistemas de incubación hecho el mismo día.

obtenidas de ambos grupos. Se observó una diferencia en la actividad de los sistemas similar a la reportada en la fig. (12) para grupos control y tratados con FPGAH fig. (13). Para comprobar este hallazgo se separaron ribosomas y fracción pH 5 del cerebro de dos grupos de animales control y uno de animales tratados con FPGAH en el mismo día y se midió la síntesis de proteínas "in vitro", como se observa en la fig. (14), la diferencia entre cada uno de los controles y el tratado es de la misma magnitud que la diferencia encontrada entre ambos controles.

crado en la regulación de la síntesis de proteínas. El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo fundamental el estudio del efecto de la FPGAH sobre la síntesis de proteínas de distintas partículas subcelulares del cerebro.

En la separación de las fracciones subcelulares se observó primero la distribución que presentaban en el gradiente, haciendo uso de marcadores enzimáticos y verificando posteriormente su pureza por medio de Microscopía Electrónica, de tal manera que pudo observarse que las fracciones 1 y 2 corresponden a la fracción soluble celular; 3, 4 y 5 a estructuras membranales, 6 y 7 a sinaptosomas y en las fracciones 8, 9 y 10 aparecen mitocondrias Figuras (2, 3, 4, 5, 6).

El hecho de que la leucina  $^{14}\text{C}$  agregada al homogeneizado de cerebro y colocado en un gradiente no apareciera incorporada a proteínas, es una evidencia de que los resultados obtenidos corresponden realmente a la incorporación de dicho aminoácido a proteínas en el sistema ensayado. Se observó que la proteína en el gradiente presenta la misma distribución en animales controles y tratados; esto es, el tratamiento con la droga no afecta dicha distribución, lo cual permite hacer una comparación adecuada entre los grupos experimentados. La incorporación de leucina  $^{14}\text{C}$  a proteínas de todas las fracciones del gradiente se ve afectada por la disminución en los niveles de GABA producidos por la droga, pero

## CONCLUSIONES.

Los datos obtenidos en los experimentos "in vivo" son considerados con la idea de que el GABA puede funcionar como regulador de la síntesis de proteínas en el SNC, expresada anteriormente por otros autores (9,19,35). En relación con el sistema ribosomal empleado en los experimentos "in vitro", no podemos asentar definitivamente que no se encontró el efecto esperado, sino que las técnicas, como lo indican también los hallazgos de otros grupos (35,38), no son las más adecuadas para estudiar el posible papel del GABA en la síntesis de proteínas cerebral.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Whittaker V.P. The Synapse (1968) Proc.N.A.S. 60 1081-1090.
- 2.- Aprison M.H., R.A. Davidoff and Werman R. (1970) in Handbook of Neurochemistry vol.V (Lajtha A.,ed) p.p 381-393, Plenum Press, New York.
- 3.- Baxter C.F. (1970) in Handbook of Neurochemistry vol. V (Lajtha A., ed) p.p 289-335, Plenum Press, New York.
- 4.- Haber B., Kuriyama K. and Roberts E. (1970) Biochem Pharmac. 19: 1119-1136.
- 5.- Roberts E. and Frankel S. (1950) J. Biol. Chem. 187; 55-63.
- 6.- Hermann R.L. (1971) in Handbook of Neurochemistry vol. V B (Lajtha A., ed) p.p 481-486, Plenum Press, New York.
- 7.- Roberts S. (1971) vol. V A in Handbook of Neurochemistry (Lajtha A., ed) p.p 1-39 Plenum Press, New York.
- 8.- Bachelard H.S. (1966) Biochem. J. 100; 131.
- 9.- Campbell K.M., Mahler H.R., Moore W.J. Tewari S. (1966) Biochem. 5 ; 1174-1184.
- 10.- Cotman C.W. and Taylor D.A. (1971) Brain. Res. 29; 366-372.
- 11.- Morgan I.G. and Austin L. (1968) J. Neurochem. 15; 41.
- 12.- Austin L., Morgan I.G. (1967) J. Neurochem. 14 ; 377.
- 13.- Gordon M.W. and Deanin G.G. (1968) J. Biol. Chem. 243; 4222.
- 14.- Autilio L.A., Appel S.H., Pettis and Gambetti P.L. (1968) Biochem. 7; 2615.
- 15.- Roberts S., Zomzely C.E. and Bondy S.C. (1970) in Protein

Metabolism of the Nervous System (Lajtha A., ed) p.p 3-37 Plenum Press, New York.

- 16.- Murthy Mr R.V. (1966) Biochem. Biophys. Acta. 119; 586-598.
- 17.- Grand R.J. and Gross P.R. (1970) Proc. of the Nat. Acad. of Sci. 65; 1081.
- 18.- Wurtman R.J., Shein H.M. Axelors J. and Loren F. (1969) Proc. of the Nat. Acad. of Sci 62; 749.
- 19.- Tewari S. and Baxter C.F. (1969) J. Neurochem. 16; 171-180.
- 20.- Tapia R., Sandoval M.E. enviado a publicación.
- 21.- Tapia R., Pérez de la Mora M. and Massieu, G.H. (1969) Ann. N. Y. Acad. Sci. 166; 257-266.
- 22.- Tapia R. and Pasantes H. (1971) Brain Res. 29; 111-122.
- 23.- Gilbert J.M. (1972) J. Biol. Chem. 247; 6541-6550.
- 24.- Ramírez G., Levitan I.B. and Mushynski (1972) J. Biol. Chem. 217; 5382-5390.
- 25.- Tapia R. Pérez de la Mora M. and Massieu G.H. (1967) Biochem. Pharmacol. 16; 1211-1218.
- 26.- Johnson T.C. (1968) J. Neurochem. 15; 1159.
- 27.- De Robertis et al (1962) J. Neurochem 9; 23.
- 28.- Bergmeyer H.U. Bernt E. and Hess B. (1963) in Methods in Enzymatic Analysis p.p. ~~355~~ 736, Academic Press New York.
- 29.- Ellman G.L. et al (1961) Biochem. Pharmac. ) 7; 88.
- 30.- Fraenkel C., H. Singer B. and Tsugita A. (1961) Virology 14;



- 31.- Lerner M. and Johnson T. (1971) J. Neurochem 18; 193.
- 32.- Lowry D.H., N.J. Rosenbraugh, A.L. Farr. and R.J. Randall (1951) J. Biol. Chem. 193; 265-275.
- 33.- Obata K. and Takeda K. (1969) J. Neurochem. 16;1043.
- 34.- Krnjević., and Schwartz S. (1967) Exp. Brain Res. 3;320.
- 35.- Baxter C.F. and Tewari S. (1970) in Protein Metabolism of the Nervous System (Lajtha A. ed) p.p 439-457 Plenum Press, New York.
- 36.- Kelly S. P. T. and Luttges M. W. (1972) Neuropharmacology 11; 889-893.
- 37.- Goldberg M.A. (1971) Brain Res. 39; 171-179.
- 38.- Baxter U.F., Tewari S. and Raeburn S. (1972) Adv. in Biochem. Psychopharm. 4; 195-216.
- 39.- Iversen and Snyder (1968) Nature 220;796-798.