

00562



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

5
2E

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS Y LIBERACION *IN VIVO* DE PROTEINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE MAMIFEROS (RATA).

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A:

M. C. FELIPE LEFF GELMAN



MEXICO, D.F.

273374

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

9 FABRICATION

10

SCOTT THURA

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO LA ORIENTACION Y EL APOYO PROPORCIONADOS POR MI TUTOR DR.: ALEJANDRO BAYON CASO. (Q.E.P.D) EN EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACION.

EXTIENDO MI INFINITO AGRADECIMIENTO A MI AMIGO Y COLABORADOR DR. BENITO ANTON PALMA, POR SU APOYO Y DESINTERESADA COLABORACION EN EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACION SE
DESARROLLO EN LOS SIGUIENTES LUGARES:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FISILOGIA
CELULAR (I.F.I.C.E), DEPARTAMENTO DE
NEUROCIENCIAS, UNAM.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
(I.I.B.M.), DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGIA
MOLECULAR, UNAM.

INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRIA (I.M.P.),
LABORATORIO DE NEUROQUIMICA, DIVISION DE
INVESTIGACIONES CLINICAS.

A ESTAS DEPENDENCIAS MENCIONADAS HAGO
PATENTE MI RECONOCIMIENTO.

**A MIS PADRES
A MI HERMANO
A MI HIJO
Y A TODOS MIS AMIGOS**

**POR SU CARIÑO, AMISTAD,
APOYO Y COMPRENSION**

INDICE GENERAL

PAGINAS

INDICE GENERAL.....	I
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE FIGURAS DE RESULTADOS EXPERIMENTALES	V
INDICE DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN	IX
SUMMARY.....	X
I.- INTRODUCCION.....	1
II.- LA NEUROQUIMICA IN VIVO.....	3
1).- Cánulas de perfusión.	
III.- PROTEINAS Y ENZIMAS COMO POSIBLES MENSAJEROS EN LA COMUNICACIÓN QUIMICA INTERNEURONAL.....	9
1).- Generalidades.	
2).- Rutas de secreción en células eucarióticas.	
3).- Aspectos moleculares de la secreción neuronal.	
4).- Liberación de proteínas en el Sistema Nervioso Central y Periférico de mamíferos.	
a).- Liberación <i>in vivo</i> de proteínas a liquido cefaloraquídeo (LCR) y espacio extracelular (EEC).	
b).- Liberación <i>in vitro</i> de proteínas al espacio extracelular(EEC).	
5).- Proteínas Especificas : Cromograninas	
6).- Proteínas Especificas : Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa	
a).- Introducción.	
b).- Secreción neuronal de Acetilcolinesterasa.	
c).- Liberación neuronal de Acetilcolinesterasa :Estudios <i>In Vitro</i> .	
d).- Funciones no colinérgicas de la Acetilcolinesterasa.	
7).- Liberación de enzima : Deshidrogenasa Láctica y Dopamina-beta- Hidroxilasa.	
a).- Deshidrogenasa Láctica (LDH).	
b).- Dopamina Beta Hidroxilasa (DBH).	

- 8).- Neurotrofinas
 - a).- Introducción.
 - b).- Neurotrofinas y sus receptores
- 9).- Síntesis de proteínas en el SNC de vertebrados e invertebrados
 - a).- Introducción.
 - b).- Condensación y segregación de proteínas en tejidos exocrinos y endocrinos.
 - c).- Modificación postraducciona l de proteínas de secreción.
 - d).- Síntesis y transporte axonal de proteínas en el SNC.
 - e).- Transferencia de proteínas de origen glial al axón.
 - f).- Aspectos relevantes en la interacción neurona-glia.
 - g).- Transporte transneuronal de proteínas secretorias.

IV - HIPOTESIS GENERAL Y EXPERIMENTAL	38
V.-. OBJETIVOS EXPERIMENTALES	39
VI.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	40
1.- Cánula de perfusión.	
2.- Procedimientos quirúrgicos.	
3.- Procedimientos de perfusión.	
4.- Ensayo de muestras biológicas.	
5.- Estudios de incorporación del trazador ³⁵ S-metionina a proteína tisular en el estriado de la rata.	
a).- Incorporación del trazador radioactivo a homogenados y explantes de tejido estriatal.	
b).- Incorporación <i>in vivo</i> del trazador radioactivo al tejido estriatal de la rata.	
6.- Difusión del trazador radioactivo ³⁵ S-metionina en el cerebro de la rata.	
7.- Ensayos de cromatografía en placa fina .	
VII.- RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	44
VIII.- DESCRIPCION DE FIGURAS DE RESULTADOS	48
IX.- RESULTADOS EN PUBLICACIONES ANEXADAS I Y II.....	53

I).- Bayón, A., Antón, B., Leff, P., and Solano , S. (1986). Release of proteins , enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins, from the striatum of the freely moving rat. Ann. N.Y. Acad. Sci. 473 : 401-417.

II).- Phillipe Leff y Benito Antón. (1999). Síntesis y liberación *in vivo* de proteínas en el sistema nervioso central de la rata. Salud Mental. Vol. 22 (1) : 35-45.

IX- DISCUSION DE RESULTADOS.....	54
XI- CONCLUSIONES.....	59
XII- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	60

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- Ilustración esquemática de diferentes tipos de sinápsis que establecen las neuronas en el SNC de mamíferos.

FIGURA 2.- Modelo de cánula Gaddum-Myers

FIGURA 3.- Modelo de un sistema de perfusión aislado de la presión atmosférica

FIGURA 4.- Modelo de cánula con ranuración en el extremo terminal del sistema de extracción.

FIGURA 5.- Representación esquemática de los constituyentes moleculares de una vesícula sináptica colinérgica.

FIGURA 6.- Componentes moleculares involucrados en la fusión de vesículas secretorias a la membrana plasmática.

FIGURA 7.- Caracterización molecular de la Cromogranina A.

FIGURA 8.- Representación esquemática de las diferentes formas moleculares de la AChE y su anclaje a las membranas plasmáticas.

FIGURA 9.- Hipótesis sobre la regulación de la síntesis de AChE por el dipéptido Gly-Gln en neuronas adrenérgicas del ganglio cervical superior.

FIGURA 10.- Síntesis, almacenamiento y liberación de catecolaminas.

INDICE DE FIGURAS DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

FIGURA 1.- Determinación de ^{35}S -metionina en homogenados hervidos.

FIGURA 2.- Determinación de ^{35}S -metionina en extractos de estriado hervidos.

FIGURA 3.- Determinación in vivo de ^{35}S -metionina en el estriado de la rata (0.5 hrs.)

FIGURA 4.- Determinación in vivo de ^{35}S -metionina en el estriado de la rata (4 hrs.).

FIGURA 5.- Determinación de ^{35}S -metionina en diferentes regiones anatómicas del cerebro de la rata.

FIGURA 6.- Determinación de la liberación de ^{35}S -metionina libre en perfusados del tejido estriatal.

FIGURA 7.- Efecto dual del Ca^{++} externo durante su secuestro intracelular.

INDICE DE ABREVIATURAS

Ach.- acetilcolina

AChE.- Acetilcolinesterasa (fracción específica)

ATP.- Adenosina Trifosfato

BDNF.- Brain Derived-Neurotrophic Factor (por sus siglas en ingles)

ChE.- Colinesterasa inespecíficas

DA.- Dopamina

DBH.- Dopamina-Beta-Hidroxilasa

EEC.- Espacio extracelular

EGTA.- Etilénglicol- bis (beta-aminoetiléter)-N, N'-ácido tetra-acético

EIC.- Espacio intracelular

GDNF.- Glial-Derived-Neurotrophic Factor (por sus siglas en ingles)

IHQ.- Inmunohistoquímica

IOC.- Inyección intra-ocular

kDa.- kilo-daltones

IGF.- Insulin like Growth Factors (por sus siglas en ingles)

IOC.- Inyección intraocular

LCR.- Líquido cefaloraquídeo

³H-Leu.- Leucina tritiada

LDH.- Enzima láctico deshidrogenasa

LHRH.- Hormona liberadora de la hormona luteinizante.

μ Ci.- microCuries

MOR.- Movimientos oculares rápidos

MRL.- Material reactivo a Lowry

NA.- noradrenalina

NE.- norepinefrina

NILE.- Proteína ácida externa inducida por el factor de crecimiento nervioso (NGF).

NGF.- Neural Growth Factor (por sus siglas en ingles)

NGL.- Núcleo Geniculado Lateral

NPV.- Núcleo Paraventricular

NPY.- Neuropeptido Y

NSO.- Núcleo Supraóptico

PDNF.- Platelet-Derived-Neurotrophic Factor (por sus siglas en ingles)

M.M.- Masa molecular

REM.- Rapid Eye Movements (por sus siglas en ingles)

RKB.- Ringer-Krebs-Bicarbonato

RNA_m.- Acido ribonucleico mensajero

SMT.- Somatostatina

SNC.- Sistema Nervioso Central

SNP.- Sistema Nervioso Periférico

$t_{1/2}$ - Vida media

RESUMEN

“ SINTESIS Y LIBERACION *IN VIVO* DE PROTEINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE MAMIFEROS (RATA) ”

La regulación fisiológica de los eventos neuroquímicos y su integración dentro del funcionamiento del sistema nervioso central pueden ser estudiadas a través de las técnicas de perfusión *in vivo*. Para lograr la perfusión *in vivo* de núcleos profundos del cerebro se requiere de sondas o cánulas de infusión-extracción (push-pull) confiables y de sistemas de presión amortiguantes que permitan la administración de líquidos fisiológicos al parénquima cerebral. Estas manipulaciones facilitan no solo la introducción de compuestos químicos y agentes farmacológicos sino que además permiten la colección y análisis de muestras biológicas obtenidas de estructuras nerviosas definidas. A través de la manipulación de las técnicas de perfusión en el animal *in vivo* aunadas a las modificaciones realizadas a la cánula de perfusión y al sistema de extracción, respectivamente; se logra incrementar el área de difusión entre el tejido y el medio de perfusión, la respuesta tisular a la estimulación local del tejido a lo largo de las sesiones de perfusión; y asimismo se logra la disminución de los accidentes hidrodinámicos, inducidos por lesiones mecánicas que se producen por los sistemas de perfusión cerrados a la presión atmosférica. La aplicación de las modificaciones en nuestro sistema de perfusión, las cuales consistieron; en la modificación del diseño geométrico de la cánula concéntrica de uso común (Gaddum-Myers) y la apertura del sistema de extracción a la presión atmosférica, permitió coleccionar en forma exitosa muestras de perfusado del estriado de la rata, correspondientes a la liberación espontánea y liberación estimulada de material proteico endógeno determinado por el método de Lowry, posterior a la despolarización química del tejido estriado con un medio de perfusión conteniendo 50 mM del ion K^+ en presencia de EGTA o del antagonista de canales de calcio, Verapamil.

Asimismo, se exploró el origen celular del material proteico liberado, a través de la inyección de un pulso único del precursor metabólico radioactivo ^{35}S -metionina al estriado de la rata. Estos estudios demostraron que solamente una pequeña fracción del material proteico endógeno sintetizado *de novo* es liberable de sus pozas endógenas posterior a la estimulación química del estriado de la rata. Dicha liberación resultó ser dependiente de la presencia extracelular del ion calcio, observándose que dicha liberación fisiológica ocurre en forma similar con la liberación de los neurotransmisores peptídicos y no peptídicos, proteínas endógenas como la Acetilcolinesterasa, Dopamina-Beta-Hidroxilasa, Cromograninas y Neurotrofinas en el sistema nervioso central de mamíferos. En adición estos estudios muestran la relevancia funcional que pudieran ejercer estas moléculas de naturaleza proteica en la regulación de la transmisión sináptica.

SUMMARY

"IN VIVO RELEASE OF NEWLY SYNTHETIZED PROTEIN LIKE MATERIAL FROM THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF MAMMALS (RAT)".

The physiological regulation of neurochemical events and their integration into neural function can be studied through out the *in vivo* approach of the perfusion techniques. The *in vivo* perfusion of deep brain nuclei requires reliable probes and pressure buffering systems to allow the administration of physiological fluids into the brain. This set of manipulations facilitates the introduction of chemical and pharmacological compounds as well as sampling chemicals into and from defined neural structures. Through out the manipulation of the perfusion techniques, and the modification performed on the perfusion cannula and extraction systems, we have succeeded in increasing the diffusion exchange area between the tissue and the perfusion medium, the neural responsiveness of the tissue to local stimulation along the perfusion sessions, and decreasing the hydrodynamics accidents induced by the mechanical lesions produced by perfusing devices (i.e., extraction systems close to the atmospheric pressure). Using our modifications performed on the perfusion system, which consist on a novel design on the geometry of the most common used concentric push-pull cannula (Gaddum_Myers) and the opening of the extraction system to the atmospheric pressure, we succeeded in collecting perfusate samples of both spontaneous and evoked release of protein like material, estimated by the method of Lowry, after depolarizing the nerve tissue (striatum of the rat) with perfusion media containing 50 mM K⁺, either in the presence of EGTA or the calcium-channel blocker Verapamil. In addition, we explored the possible cell origin of the release material, by *in vivo* injecting a single pulse of a radiolabeled metabolic precursor (³⁵S-Methionine) into the striatum of the rat. Briefly, we showed that a small fraction of the endogenous protein material synthesized is released by striatal neurons and such release is dependent on the presence of extracellular calcium, which support the hypothesis that these protein material secreted into the extracellular space might exert important actions at the synapsi, as shown for other neuroactive substances, including, the vast number of peptidergic and non peptidergic transmitters as well as neurotrophic substances (neurotrophins), and enzymes such as Dopamine-Beta-Hydroxylase and Acetylcholinesterase.

INTRODUCCION

El avance científico esta vinculado al desarrollo de métodos y estrategias experimentales que permiten observar, analizar y cualificar los fenómenos naturales. Desde el inicio del presente siglo, el funcionamiento del sistema nervioso de los mamíferos ha sido una de las interrogantes que mas ha atraído la atención de la investigación neurocientífica. El descubrimiento de la unidad anatómo-funcional que conforma el sistema nervioso central de todo mamífero, la neurona, ha permitido sentar las bases para explicar el funcionamiento de la comunicación química interneuronal.

Hacia 1906, Sherrington denomina el termino sinápsis al sustrato anatómico que determina la comunicación entre las células nerviosas. Paralelamente, Bois, Raymond, Elliot, Loewi y Dale establecen los principios de la teoría química de la comunicación interneuronal. De esta forma, se establece que la transmisión nerviosa se inicia con la llegada del impulso nervioso a la terminal sináptica, induciéndose la liberación de un "mediador químico" al espacio intersináptico, que al interactuar con la membrana de la célula posináptica (mediado a través de la interacción del ligando (agente neurohumoral) con un receptor específico, generando mecanismos de señalamiento de postraducción membranar (v.g., proteínas G, generación de AMPc y proteínas-cinasas, etc.), se genera una señal eléctrica, propagándose el impulso nervioso a través de vías neuronales específicas. Estos agentes neurohumorales han sido definidos como neurotransmisores de naturaleza peptídica y no peptídica.

Bajo este contexto general, un criterio importante para catalogar una sustancia química como neurotransmisor es la *demostración experimental de su liberación en condiciones fisiológicas*. Las técnicas neuroquímicas que permiten el análisis *in vitro* han brindado un avance sustancial en el estudio de los eventos neuroquímicos que se suscitan en la neurotransmisión.

A pesar de la complejidad del sistema nervioso, se tiene la convicción de que la *transmisión del impulso nervioso de una neurona a otra* representa el evento fundamental en la función neural, lo que ha propiciado el desarrollo de uno de los enfoques mas exitosos desde el punto de vista experimental en la neurociencia actual; el estudio del funcionamiento del sistema nervioso a través del papel fisiológico que desempeñan los neurotransmisores en la expresión de estados conductuales en el animal de experimentación. Esto ha permitido generar dentro del contexto de la neuroquímica actual el concepto de "la codificación neurohumoral de las funciones cerebrales" (Myers y Drucker-Colin, 1974), donde a través de nuevas alternativas metodológicas y estrategias experimentales se ha podido evaluar los eventos neurobiológicos implicados en la transmisión sináptica en estructuras neurales definidas que asociados con la preservación de la conectividad nerviosa con el resto

del cerebro, se ha facilitado el estudio de la neuroquímica *in vivo* y su correlación con la conducta desarrollada en el animal bajo experimentación.

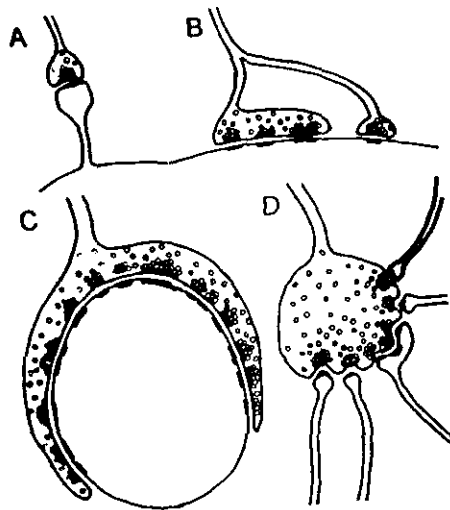


Figura 1.- Ilustración esquemática de diferentes tipos de sinápsis que establecen las neuronas del SNC de mamíferos

A).- Representación esquemática de un botón sináptico en contacto con una espina dendrítica ; donde se observan una especialización pre y posináptica a nivel membranal.

B).- Se muestra un axón que hace múltiples contactos sinápticos en el soma o tallo dendrítico en una neurona posináptica;

C).- Ejemplo de un contacto sináptico de tipo "Calix" donde se establecen millares de especializaciones sinápticas,

D).- Contacto sináptico tipo glomerular, entre una terminal axónica y múltiples dendritas (Walmsley y col., 1998).

LA NEUROQUIMICA IN VIVO

La experimentación neuroquímica en regiones cerebrales aisladas y/o en estructuras celulares (v.g., cultivos celulares) y subcelulares (sinaptosomas) mecánicamente fraccionadas, han facilitado el control de las condiciones experimentales sobre las cuales son estudiadas. Más aun, el aislamiento tiene como consecuencia la pérdida de las conexiones nerviosas con el resto del cerebro y del organismo entero. Por lo que los enfoques experimentales realizados *in vivo*, obtienen una gran ventaja para estudiar la regulación fisiológica de los eventos neuroquímicos con relación a la integración con las funciones cerebrales del animal *in vivo*. Bajo este contexto, la técnica de perfusión *Push-Pull* (infusión-extracción de líquidos artificiales) ha demostrado ser una herramienta de extrema utilidad en el estudio de la liberación *in vivo* de agentes neuroactivos en el sistema nervioso central de animales en libre movimiento. Este procedimiento permite realizar estudios en regiones cerebrales específicas, en particular en áreas anatómicas profundas del cerebro del animal (v.g., ganglios basales) donde la preservación de las conexiones neurales es crítico para evaluar los eventos neuroquímicos y conductuales que se suscitan en el animal consciente. Asimismo, a través de la infusión y extracción continua de líquidos fisiológicos artificiales conjuntamente con la recolección inmediata de muestras biológicas en el sitio de perfusión, mediante la disposición de cánulas concéntricas (infusión-extracción) acopladas a un sistema de bombeo, se favorece la administración y recolección de sustancias químicas del tejido cerebral.

1.- Cánulas y Sistemas de perfusión.

Desde finales de la década de los 50's, Fox y Hilton (1958) diseñaron un sistema de tubos paralelos para perfundir tejido subcutáneo. Este sistema modificado, inicialmente por Gaddum (1961) y posteriormente por Myers (Myers y Beleslin, 1970), permitió adaptar un sistema de tubos concéntricos de infusión y extracción para estudiar y localizar el sitio de liberación de sustancias en el sistema nervioso central de mamíferos, técnica que revolucionó el estudio de la neuroquímica *in vivo*.

El principio funcional de estas cánulas concéntricas se basa en la infusión controlada y extracción simultánea de líquidos fisiológicos a través del tejido nervioso. La disposición intracerebral de esta cánula permite la formación de una superficie de contacto y difusión bidireccional que se establece entre el líquido administrado y el área tisular perfundida. Asimismo, es posible administrar diversos agentes neuroactivos resuspendidos en el líquido de infusión (v.g., neurotransmisores exógenos, fármacos, etc.) y recolectar en forma fraccionada el líquido extraído del cerebro del animal *in vivo* para su análisis ulterior (Bayón y Drucker-Colin., 1985; Bayón 1987). El diseño de cánulas concéntricas de uso común (Gaddum-Myers) (

figura 2) implantadas en el animal de experimentación se basa en la protrusión de la tubería interna (infusión) del cuerpo de la tubería exterior (extracción).

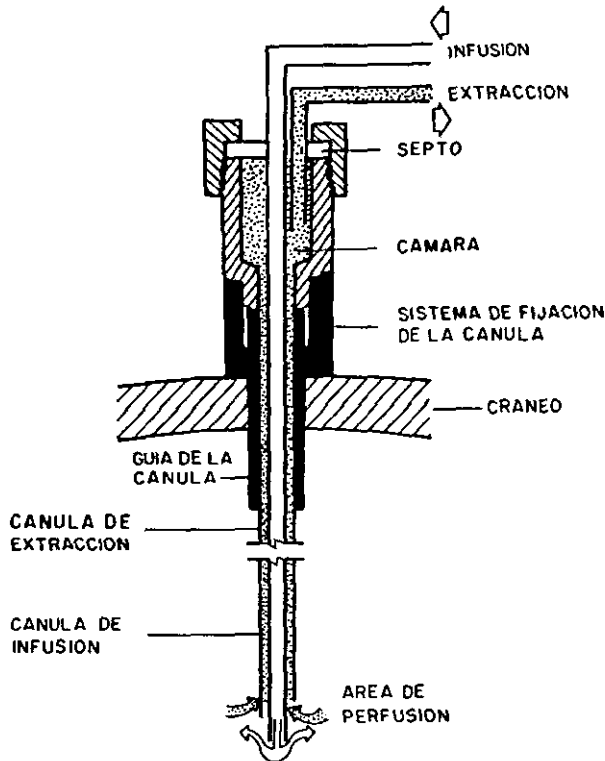


Figura 2.- Modelo de Cánula Gaddum-Myers. Este sistema está conformado por dos sistemas de tuberías concéntricas; una tubería de infusión (blanco) y otra tubería de extracción (punteado), separados por dos piezas de acero inoxidable atornilladas entre sí (achurado), que conforman la cámara superior. Esta cánula de perfusión es fijada al cerebro del animal por medio de una cánula-guía (negro). La cánula de infusión protruye del cuerpo de la tubería de extracción, permitiendo la salida de líquido al tejido. La circulación de líquido está mediada por la diferencia de presiones en el sistema de bombeo cerrado a la presión atmosférica, limitando el cambio de presiones que dañan el tejido durante los ensayos de perfusión.

Uno de los factores que limitan el uso común de estas cánulas (conectadas mediante tuberías de polietileno a bombas de perfusión) es la aplicación de sistemas de bombeo continuos, cerrados a la presión atmosférica; lo que produce durante la experimentación altos índices de fracasos debido al desarrollo de presiones negativas que se ejercen en el sitio de perfusión, que adicionalmente al efecto erosivo del líquido de perfusión que baña el tejido, producen fragmentación del tejido y sangrados profusos lo que determina la frecuente obliteración de la porción terminal del tubo de extracción, produciendo una obstrucción en el flujo de líquido y la alteración de la viabilidad de la preparación (figura 3),

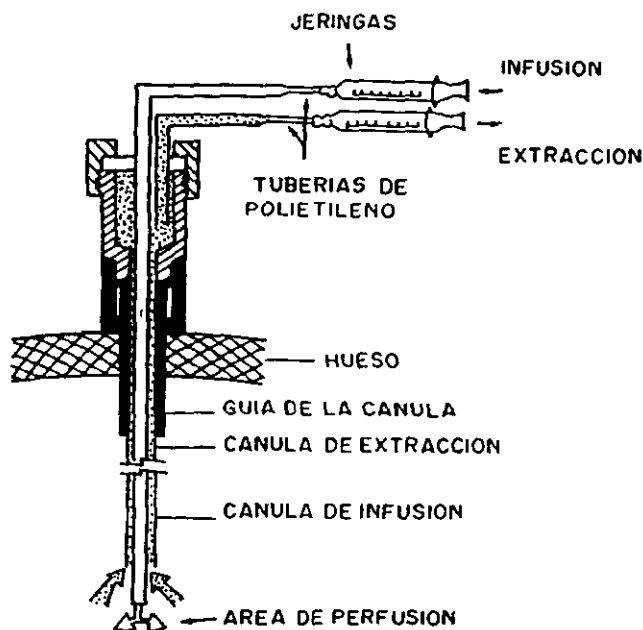


Figura 3.- Modelo de un sistema de perfusión aislado de la presión atmosférica

La cánula de perfusión fijada al cerebro del animal, está conectada a través de tuberías de polietileno a jeringas reciprocantes acopladas a una bomba de perfusión, que permite la infusión y extracción de líquidos mediante la aplicación de presiones simultáneas establecidas por la velocidad de flujo que se determina en el sistema de bombeo.

Con el objeto de minimizar el daño mecánico inducido por la circulación de líquido en el sitio de perfusión, nuestro laboratorio realizó una modificación en la geometría de la cánula de uso tradicional.

En nuestro modelo de cánula se realizó una "ranuración o hendidura" en la porción terminal del cuerpo externo de la cánula (tubería de extracción) con el objeto de aumentar el área de perfusión (de 1 mm^2 a $2-2.5 \text{ mm}^2$) / volumen de líquido infundido por unidad de tiempo (ver figura 3). Asimismo, la tubería interna (push) se ocultó del cuerpo de la tubería externa, con el objeto de minimizar en lo posible la erosión del tejido perfundido, por el líquido circulante, modificándose adicionalmente el sistema de perfusión, donde el sistema de extracción cánula externa-bomba polistáltica se expuso a la presión atmosférica, modificándose las velocidades relativas de infusión ($50 \mu\text{l}/\text{min}$) y extracción ($100 \mu\text{l}/\text{min}$) (Bayón y col., 1985) (ver figura 4).

Los cambios de presión hidrostática en el área de perfusión se dan básicamente por la presencia de una presión positiva en el sistema de infusión, lo que conlleva la acumulación de líquido, desplazamiento y ruptura de los elementos tisulares en el área perfundida y/o la existencia de presiones negativas en el sistema de extracción, que originan la erosión y lesión en el tejido, logrando la obstrucción en el flujo del líquido de perfusión. Cuando son utilizados procedimientos de bombeo del líquido de perfusión, que no poseen la capacidad y eficiencia para equilibrar las alteraciones de presión suscitadas por cambios en la resistencia del tejido en el área de perfusión (v.g., edema, oclusión) como son los sistemas "cerrados" de perfusión, que mantienen un flujo constante a lo largo del área tisular perfundida (aislado de la presión atmosférica), se producen con alta frecuencia los fenómenos mencionados anteriormente.

Sin embargo, los sistemas "abiertos" a la presión atmosférica (diagrama 2, en publicación Salud Mental, anexada) no requieren de mecanismos de infusión y extracción de alta precisión y utilizan bombas peristálticas pulsátiles que infunden y extraen líquido al presionar peristálticamente tuberías de silastic o teflon colocadas sobre rodillos que giran a la velocidad deseada. El balance de entrada y salida de líquido en el área de perfusión se logra mediante la apertura del sistema de extracción (v.g., tubería de extracción) a la presión atmosférica (Neouillon y col., 1977). De esta forma, los cambios de presión pueden ser equilibradas por la entrada de aire dentro del sistema de extracción cuando la resistencia del tejido varía, evitándose el desarrollo de presiones negativas en el sitio de perfusión (Bayón y col., 1985, 1986).

En estudios preliminares se comprobó el funcionamiento de los dos diseños de cánula con el propósito de registrar el daño y viabilidad del tejido perfundido. Se utilizaron marcadores químicos (proteína endógena total, actividades enzimáticas como LDH, colinesterasas y proteasas) y físicos de lesión (sangrados y alteración en la recuperación del líquido de perfusión) (Bayón y col., 1985) así como un marcador interno para determinar el proceso de difusión tejido-medio de perfusión (analizado

por medio de la concentración de proteína endógena) y un marcador externo, indicador de difusión, medio de perfusión-área de tejido perfundido (analizado por medio del índice de captura tisular de ^3H -GABA) (Bayón y col., 1985, 1986). La viabilidad del tejido durante la perfusión se determinó en base a la respuesta del tejido por liberar en condiciones basales y en condiciones de estimulación química con soluciones despolarizantes que contienen una alta concentración del ion K^+ (50 mM) neurotransmisores peptídicos y no peptídicos. (Bayón y col., 1986).

La aplicación del modelo de cánula de perfusión modificada en nuestro laboratorio, produjo resultados positivos en cuanto a la reducción del índice y frecuencia de obstrucciones a lo largo de las sesiones de perfusión continua (6-8 hrs), minimizando la presencia de lesiones mecánicas y manteniendo una eficiencia en la perfusión continua de líquidos artificiales, lo que determinó la recolección continua de muestras biológicas durante las sesiones de perfusión en el animal en libre movimiento.

La confiabilidad, reproducibilidad y resolución temporal que ofrece esta técnica de perfusión, nos han permitido extender su uso al estudio de los mecanismos que regulan la liberación *in vivo*, de sustancias neuroactivas en estructuras anatómicas definidas como el estriado de la rata, lo que permite analizar y asociar la experimentación neuroquímica con cambios conductuales en el animal consciente.

El desarrollo de diversos procedimientos metodológicos de perfusión y técnicas análogas implementadas inicialmente por Gaddum-Myers, ofrecen y exhiben el mismo procedimiento funcional de perfusión previamente expuesto. (Feldberg y Myers, 1966; Carr y Moore, 1969; Besleslin y Myers, 1970). Sin embargo, la utilidad de éstas, se encuentra restringida a superficies o cavidades cerebrales y son técnicamente inadecuadas para estudiar eventos neuroquímicos en regiones discretas localizadas en el interior del parénquima cerebral (Kovacs, 1976; Ungerstedt, 1982; Hamberger y col., 1985). Las membranas de diálisis originalmente descritas por Delgado (Delgado, 1970), ofrecen una ventaja experimental en el estudio neuroquímico de áreas discretas del cerebro, pero su desventaja radica en la presencia de una membrana de permeación que permite una lenta y baja eficiencia en el intercambio de líquido infundido y el tejido perfundido. Aunque hoy en día este diseño y procedimiento de perfusión ha sido reemplazado por el desarrollo de nuevos sistemas de perfusión que utilizan sondas de microdiálisis (Arias y col., 1998; Remblie y col., 1998; Kikuchi y col., 1998; Ikarashi y col., 1998; Konya y col., 1998), su uso experimental es inadecuado en el estudio de la liberación de agentes neuroactivos de alta masa molecular (v.g., proteínas), al restringir la permeabilidad de proteínas con diferentes masas moleculares.

Asimismo, la utilización y aplicación de diferentes técnicas de perfusión *in vivo* han favorecido el estudio de la regulación de la liberación de diferentes péptidos bioactivos localizados en discretas áreas anatómicas del cerebro del animal (Bayón, 1981^a; Landgraf, 1996; Wotjak y col., 1996; Cardenas y Ramirez, 1996; Saleh, 1997; Tohei y col., 1998; Morris y Pavia, 1998;).

En general, nuestros resultados muestran que el uso combinado de nuestro modelo de cánula de punta ranurada y el sistema de extracción abierto a la presión atmosférica, demuestran ser una técnica eficaz y confiable en la detección de la liberación *in vivo* de neurotransmisores exógenos (GABA- H^3), proteína endógena y proteína endógena marcada con el precursor metabólico Metionina- S^{35} (Leff P. y Antón B., 1999, publicación anexada) evocada por la estimulación química y/o farmacológica del tejido cerebral.

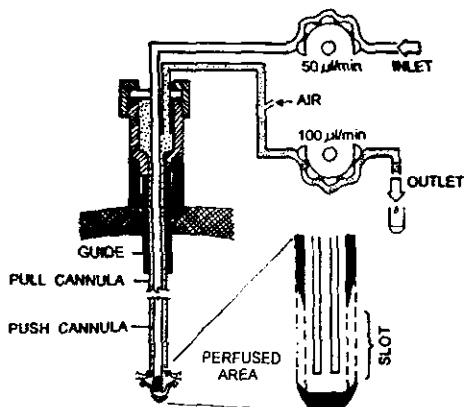


Figura 4.- Modelo de cánula con ranuración en el extremo terminal del sistema de extracción.

Al igual que la cánula Gaddum-Myers esta cánula está conformada por dos sistemas de tuberías concéntricas; una tubería de infusión (achurado) y otra tubería de extracción (punteado), separados por dos piezas de acero inoxidable atornilladas entre sí (rayado), que conforman la cámara superior..A diferencia de la anterior, el diseño de esta cánula se basa en la modificación de la geometría de la tubería de extracción, realizandose en us extremo terminal una hendidura o ranuración, que permite proteger el área tisular bajo perfusión del efecto erosionante del liquido circulante, y asimismo permite aumentar la superficie de contacto entre el liquido circulante y el tejido perfundido Las tuberías concéntricas de infusión-extracción están acopladas por tuberías de silastic a una bomba peristáltica que permite manejar diferentes velocidades de flujo de líquidos artificiales y cuyo sistema de extracción se encuentra abierto a la presión atmosférica, compensando de esta manera la diferencia de presiones ejercidas durante la perfusión del tejido (ver diagrama 2 en publicación Salud Mental, pag. 39).

PROTEINAS Y ENZIMAS COMO POSIBLES MENSAJEROS EN LA COMUNICACION QUIMICA INTERNEURONAL

1.- Generalidades

La estimulación del tejido nervioso, además de inducir la liberación de neurotransmisores de naturaleza peptídica (Bayón y col., 1985, 1986; Sirinathsinghi y col., 1989; Olive y Maidment, 1998) aminoácidos y aminas biogénicas, induce la liberación de sustancias proteicas de alta masa molecular, si bien algunas de ellas han sido bien caracterizadas (AChE; DBH, factores tróficos o neurotrofinas) (Bayón y col., 1985, 1986; Greenfield y col., 1984; Greenfield, 1991) desde el punto de vista bioquímico, fisiológico y molecular, existen una variedad de moléculas proteicas aun no caracterizadas a nivel funcional y molecular que son liberables fisiológicamente a partir de células neuronales y células gliales, presentan un potencial enorme de estudio, para identificar, caracterizar y aislar nuevas sustancias neuroactivas con posibles funciones regulatorias en la neurotransmisión del SNC de mamíferos (Bayón y col., 1985, 1986, Leff y Anton, 1999). Diversos enfoques experimentales han sido utilizados para estudiar y analizar los mecanismos y eventos químico-moleculares que regulan la secreción de las diversas moléculas neuroactivas en el sistema nervioso central. En particular aquellos que han permitido identificar, aislar, clonar y caracterizar la funcionalidad de diferentes proteínas asociadas a vesículas exocíticas involucradas en el transporte intracelular de vesículas sinápticas, la fusión de estas a la terminal presináptica (membrana vesicular/ membrana plasmática), reciclaje y endocitosis de vesículas exocíticas. Estos eventos moleculares determinan el acoplamiento del fenómeno fisiológico "estimulo-secreción" mismos que facilitan la neurosecreción de múltiples mensajeros químicos en el sistema nervioso central y glándulas de secreción interna (sistema APUD o de neurosecreción) en diversas especies de vertebrados e invertebrados (De Camilli y Reinhard, 1990; Bajjalieh y Scheller, 1995; Volkandt, 1995; Matthews, 1996).

2.- Rutas de secrecion en células eucarióticas

Las células eucarióticas se caracterizan por poseer dos rutas diferentes de secreción exocítica, mediante la cual diversos productos de secreción son depositados al espacio extracelular. La secreción de tipo *constitutiva*, ruta de secreción básica operante en todas las células de los organismos vivos, se caracteriza por el transporte constante de vesículas pequeñas (50 nm) provenientes de aparato de Golgi (*Trans-Golgi*) a la superficie celular, donde se lleva a cabo el proceso de exocitosis del contenido vesicular, mismo que no requiere el almacenamiento intermedio y

procesamiento del contenido vesicular y es responsable por el recambio de componentes membranales de la membrana de superficie (De Camilli y Reinhard, 1990). Asimismo, múltiples células diferenciadas (v.g., neuronas, células endocrinas y neuroendocrinas, etc.) responden secretando o liberando sus contenidos vesiculares a través de una ruta de secreción regulada, involucrada en la segregación, transporte, almacenamiento, concentración, procesamiento enzimático y exocitosis del material vesicular exportado (v.g., proteínas, prepropéptidos, mensajeros químicos peptídicos y no peptídicos, etc.) en respuesta a un apropiado estímulo (químico, farmacológico, eléctrico, etc.) (De Camilli Y Reinhard, 1990). La coexistencia de ambas rutas de secreción en una misma célula ha permitido esclarecer con mayor precisión los eventos moleculares que determinan las rutas de secreción celular (De Camilli Y Reinhard, 1990; Volkandt, 1994).

3.- Aspectos moleculares de la secreción neuronal

(Interacción de proteínas vesiculares y proteínas membranales)

La neurotransmisión representa la forma de comunicación primordial en el sistema nervioso central y los cambios que regulan o determinan la efectividad de este proceso, es lo que define la plasticidad cerebral en conjunto con las estructuras que conforman las múltiples conexiones sinápticas (ver figura 1) (Bajjalieh y Scheller, 1995; Matthews, 1996; Bennett y col., 1997; Bennett, 1998). La neurosecreción se distingue de la secreción constitutiva por ser regulada y activada particularmente a través de la difusión de concentraciones nanomolares del ion Ca^{2+} al espacio intraneuronal posterior a los eventos iónicos que regulan la despolarización neuronal. La secreción regulada, comparte rasgos similares con la secreción constitutiva, utilizando elementos estructurales del citoplasma (v.g., actina) que facilitan el transporte, segregación y inmovilización submembranal de vesículas exocíticas y componentes moleculares de origen membranal (v.g., fosfolípidos ácidos) que determinan y facilitan entre otras moléculas efectoras, los eventos de fusión membranal de vesículas exocíticas. (De Camilli Y Reinhard, 1990; O'Connor y col., 1994; Volkandt, 1994; Bajjalieh y Scheller, 1995). Mediante la clonación y caracterización molecular de diversas proteínas constitutivas de vesículas sinápticas se ha podido evaluar múltiples funciones relacionadas con los eventos fisiológicos y moleculares involucrados en la secreción inducida de moléculas bioactivas (neurotransmisores peptídicos y no peptídicos) (Volkandt, 1995; Matthews, 1996). Estas moléculas proteicas integradas o asociadas a la membrana vesicular han sido localizadas en distintas vesículas sinápticas (SSV y SDCV) y en vesículas secretorias (v.g., gránulos cromafines, LDCV), en el tejido neuronal y en tejidos de secreción neuroendocrina (v.g., glándula adrenal) en múltiples especies de vertebrados (v.g., rata, bovino) e invertebrados (v.g., moluscos marinos) (Volkandt, 1995; Avery y col., 1997). Estas proteínas, incluyen transportadores de moléculas pequeñas, como el complejo proteico-hetero-oligomérico que conforma la bomba protónica vacuolar;

V-ATPasa (Mr; 750 Kd); el transportador intravesicular de moléculas pequeñas (calcio, ATP, nucleótidos, cloro), la proteína neuronal SV-2A, SV-2B (M.M.,80-150 kDa), proteínas transportadoras de aminas biogénicas (ACh); VMAT-1, VMAT-2 (M.M.,; 50-65 kDa); proteínas integrales de vesículas, sensoras de Ca²⁺ intracelular, relacionadas con el proceso de secreción como la sinaptogamina-p65; sinaptogamina I, sinaptogamina III, la frequenina, la neuronal NCS-1 (Lang y col., 1997; Thomas y Elferink, 1997; Mizuta y col., 1997, Baram y col., 1998; McFerran y col., 1998); proteínas relacionadas con la fusión de vesículas con la membrana plasmática, asociadas al citoesqueleto celular (Velentijn y col., 1998), como las moléculas sinaptobrevinas/VAMPs, las sinaptofisinas, sintaxinas, rabphilina-3a (rab-3a), la proteína Noc2; así como proteínas relacionadas con la formación de poros membranales, las sinaptoporinas (Bauerfeind y col., 1995; Avery y col., 1997; Tasaka y col., 1998); proteínas relacionadas con el transporte y movilización de vesículas a sitios activos en las terminales sinápticas; como proteínas asociadas a GTP (GTP-binding proteins, Proteína Rho) (Jena y col., 1992; Gasman y col., 1997; Zhang y col., 1998); proteínas involucradas en la activación y regulación funcional de las proteínas sinápticas por fosforilación, como la calmodulina-proteína cinasa II (Ca/CaM-K II) [ver esquema de configuración membranal de vesícula sináptica colinérgica (figura 5)]. Asimismo diversos estudios han reportado la presencia de un grupo de proteínas solubles denominados como proteínas SNARE, como las proteínas vesiculares denominadas SNAPs (synaptosomal-associated proteins, por sus siglas en inglés) (v.g., SNAP-23, SNAP-25) (Hohne-Zell y col., 1997; Linial y col., 1997; Sadoul y col., 1997a y b; Huang y col., 1998; Nemoz-Gaillard y col., 1998; Gou y col., 1998). Asimismo, dentro de este grupo de proteínas, se enmarcan otras proteínas denominados CSPs (cystein string proteins, por sus siglas en inglés) (Brown y col., 1998), proteínas citosólicas dependientes Ca²⁺ y ATP, definidas como CAPs (Ann y col., 1997), la proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida, NSF (Burgoyne y Morgan, 1998); las cuales parecen regular el proceso de exocitosis de diversas vesículas endocíticas, mediando la fusión membranal de estas a la membrana celular en forma dependiente de la concentración intracelular del ion Ca⁺⁺ (O'Connor y col., 1994; Bajjaliah y Scheller, 1995; De Bello y col., 1995; Matthews, 1996; Enguish y col., 1997; Davletov y col., 1998; Koizumi e Inoue, 1998). En adición, este mecanismo de fusión membranal resulta ser dependiente de la activación de diversas proteínas cinasas dependientes e independientes de la actividad de AMPc (Naor y col., 1989; Billiard y col., 1997; Clegg y col., 1998, Scott y col., 1998, Shefler y col., 1998) que en su conjunto determinan la forma en que los mensajeros químicos son liberados por los mecanismos moleculares de exocitosis. Indistintamente, diversos estudios de inmunohistoquímica (IHQ), utilizando anticuerpos selectivos inmunoreactivos a diferentes marcadores proteicos vesiculares, han confirmado la existencia de múltiples vesículas neurosecretorias, incluyendo un subtipo de vesículas híbridas (SDCV, small dense core vesicles, por sus siglas en inglés), resultantes de la fusión de vesículas sinápticas pequeñas (SSV, small synaptic vesicles) y gránulos neurosecretorios (LDCV, large dense core vesicles) que almacenan el mismo material proteico liberable (DBH, Cromograninas, AChE, péptidos neuroactivos y aminas biogénicas e iones) (Bauerfeind y col., 1995; Goodall y col., 1997) (figuras 5 y 6).

Figura 5.-

Representación esquemática de los constituyentes moleculares de una vesícula sináptica colinérgica (Volkandt, 1994).

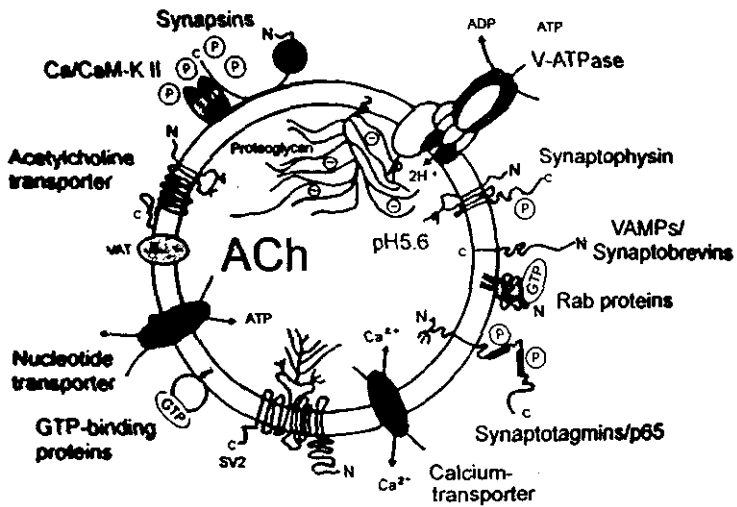
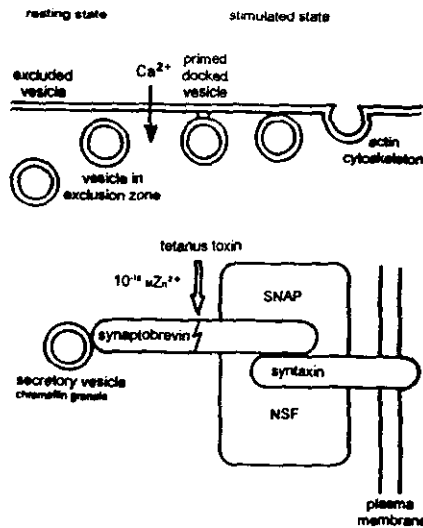


Figura 6.- Componentes moleculares involucrados en la fusión de vesículas secretorias a la membrana plasmática

En este esquema se puede apreciar la red de moléculas que intervienen en el proceso de fusión, formando partículas submembranales que determinan el sitio de acoplamiento vesícula -membrana y su fusión con esta. En la figura superior, se puede apreciar que la estimulación de la célula induce la movilización submembranal (vesicle in exclusion zone) y atracamiento de vesículas exocíticas (primed docked vesicle) en sitios activos específicos donde se efectúa la fusión vesícula-membrana, evento mediado por la presencia de proteínas del citoesqueleto como la actina. En la figura inferior, se aprecia el complejo proteico que interviene y determina el evento de fusión membranar. La vesícula secretoria asociada a la proteína sinaptobrevina interactúa con otra serie de proteínas, como la NSF (ver texto) y proteínas definidas como SNAPs (ver texto), que en conjunto con la sintaxina permiten el acoplamiento vesícula-membrana, esquematizado en este caso para los gránulos cromafines (Livett, 1993).



4.- Liberación de Proteínas en el Sistema Nervioso Central y Periférico de mamíferos.

a).- Liberación *in vivo* de proteínas al Líquido cefaloraquídeo (LCR) y al Espacio extracelular (EEC).- Diversos estudios experimentales, han mostrado la liberación fisiológica continua de proteínas hacia el líquido cefaloraquídeo en el cerebro de mamíferos (v.g., conejos, gatos) conjuntamente con la liberación inducida de neurotransmisores (v.g., 5-HT) a través la perfusión ventriculo-cisternal (Barkai y col., 1978.; Barkai, 1979, Drucker- Colin y Spanis, 1975). Estos estudios demostraron por un lado, que la concentración promedio detectada en el LCR del material reactivo a Lowry (MRL) en los perfusados colectados ($780 \pm 97 \mu\text{g/ml}$) dependía de las condiciones experimentales a los que era sujetos los animales de experimentación. Estos estudios hacen mención, que el 85 % del material proteico total estimado en este compartimento, correspondiente a proteínas con una masa molecular mayor a los 50 kDa, es secretado a una velocidad promedio de $4.5 \mu\text{g/min}$, en tanto que la administración peritoneal previa de anestésicos como el pentobarbital ($266 \pm 65 \mu\text{g/ml}$) o el tratamiento con antagonistas dopaminérgicos como el haloperidol ($166 \pm 38 \mu\text{g/ml}$), reducen significativamente (60-75 %) la velocidad de secreción de esta fracción proteica (Barkai, 1979). Mismos estudios reportan, que los niveles del material proteico de menor masa molecular ($< 50 \text{ kDa}$) en el LCR ($82 \pm 18 \mu\text{g/ml}$) la velocidad de secreción es reducida en un 50 % con el mismo tratamiento farmacológico ($1.75\text{-}2.14 \mu\text{g/min}$) (Barkai, 1979). En extensión a estos resultados experimentales, Kaczmarek y Adey observan, a través de la perfusión *in vivo* de la corteza cerebral de gatos, la liberación de glucoproteínas marcadas con precursores metabólicos radioactivos se incrementa considerablemente con la aplicación de soluciones despolarizantes que contienen 40 mM de K^+ (Kaczmarek y Adey, 1975). Sobre este contexto, Friedel y col., identifican un grupo de proteínas de origen neuronal liberados al EEC en el sistema neurosecretor fotocerebral de la langosta. Dicha liberación fue observada posterior a la estimulación y propagación de un potencial de acción. Siendo esta liberación producto de la despolarización neuronal y de la corriente entrante de Ca^{2+} al espacio intraneuronal (Friedel y col., 1981).

Diferentes líneas de investigación, empleando técnicas inmunoquímicas y métodos de doble marcaje de proteínas con aminoácidos radioactivos, reportan liberación neuronal de glucoproteínas al espacio extracelular (EEC) (Benowitz y Shashoua, 1979) durante entrenamientos conductuales específicos en vertebrados marinos, como el pez carpa; cuyo recambio se incrementa posterior a la adquisición de un aprendizaje establecido y a la consolidación de una memoria a largo plazo (Shashoua, 1985); otros grupos de investigación demuestran, mediante la perfusión de la formación reticular del cerebro de gatos, empleando cánulas de perfusión "push-pull", la correlación entre la liberación espontánea de material proteico con el desarrollo de estados conductuales (sueño) (Drucker-Colin y Spanis, 1975), cuya liberación sigue

un curso diurno de oscilación, incrementándose substancialmente durante la fase profunda del sueño REM (MOR).

b).- Liberación *in vitro* de proteínas al espacio extracelular (EEC):-

El tejido neuronal representativo de la unión neuromuscular, ha sido quizá la preparación *in vitro* más estudiada en el campo de la liberación de proteínas de origen neuronal. Los trabajos iniciales de Musick y Hubbard, y posteriormente de otros, mostraron que la estimulación del nervio frénico produce una liberación significativa y prolongada de material reactivo a Lowry (MRL) en conjunto con la liberación de ACh, en forma dependiente del Ca^{++} extracelular, misma que se incrementa con la exposición a antagonistas colinérgicos (d-tubocuramina) o con la exposición a altas concentraciones del ion K^+ (Musick y Hubbard, 1972, Bray y Harris, 1975, Musick, 1979), efecto antagonizado por iones Mg^{++} . Bajo este contexto, diversos estudios experimentales muestran que el material proteico recién sintetizado incluyendo la actividad de colinesterasas (Younkin, 1978), no solo es transportado axonalmente por nervios periféricos a diferentes velocidades (Hines y Garwood, 1977), y liberado al medio extracelular durante la estimulación eléctrica de estos (7 Hz/30-60 seg.) (Musick, 1979), sino que este material sintetizado a partir de diferentes precursores metabólicos es capaz de ser translocado transinápticamente al tejido muscular en cuatro pulsos u "ondas proteicas" diferentes (Korr y col., 1967, Appletauer y Korr, 1975), liberado al EEC en una concentración promedio de 75-125 $\mu g/l$ en 24 hrs (Hines y Garwood, 1977). Esta concentración equivale aproximadamente al 1% del contenido total de proteína tisular, y a un rango de 10-40 % de la incorporación tisular total del trazador (Leu- C^{14}). Estudios posteriores utilizando mismas preparaciones biológicas, muestran que una porción del material proteico (> 50%) es sintetizado por células gliales satélites localizadas en los ganglios simpáticos paravertebrales y/o por células de Schwann y translocada a los nervios subyacentes posterior a su difusión al EEC (Lasek, 1970, Tedechi y col., 1981).

Bajo este lineamiento, Sweadner reporta la liberación espontánea e inducida de un grupo de glucoproteínas solubles provenientes del cultivo de neuronas simpáticas del ganglio cervical superior de la rata. Sus observaciones muestran que el 2-3 % del material proteico total sintetizado *in vitro*, resulta ser estable a lo largo de 9 hrs. ($t_{1/2}$ de 9 hrs) y es liberado al medio extracelular. Este material no es producto de degradación proteolítica (el patrón electroforético de las proteínas sintetizadas *de novo*, no varía cuando se expone el material en contacto con inhibidores de proteasas) (Sweadner, 1981) Tanto la liberación espontánea como inducida de este grupo variable de proteínas provienen de terminales axónicas, dendritas y/o cuerpos neuronales, y asimismo parecen ser dependientes del grado y estado de diferenciación neuronal (Patterson, 1978, Sweadner, 1981). Estos eventos ontogénicos, parecen modificar el tipo y número de proteínas secretadas (Sweadner, 1981, Heydorn y col., 1985). En extensión a estas observaciones experimentales, Sweadner muestra que la modificación postraduccional de proteínas precursoras (P1-210 kDa, P3-215 kDa), origina la expresión e inserción membranal de proteínas de menor peso molecular

(B2-185 kDa y B4-180 kDa), ricas en manosa y no en ácido siálico, originando proteínas solubles (S1; S4) cuando el medio se condiciona para incrementar la liberación de neurotransmisores (NA, ACh). Estas proteínas solubles son liberadas al EEC en forma dependiente de la concentración del Ca^{++} externo y de la actividad de proteasas específicas dependientes de este ion cuando el cultivo es estimulado con soluciones despolarizantes (K^+ 30 mM) (Rodeman y col., 1982) (Sweadner, 1983 a y b). Estas proteínas liberadas parecen corresponder o derivar de una proteína integral de membrana previamente caracterizada llamada glucoproteína, NILE (McGuire y col., 1978).

Asimismo, diversos grupos de investigación, utilizando rebanadas de tejido cerebral, reportan la liberación tónica (no estimulada) de glucoproteínas marcadas con diferentes radioisótopos en explantes del lóbulo intermedio de la hipófisis (Thorton, 1982), la liberación in vitro de material proteico al EEC, posterior a la estimulación eléctrica del hipocampo de la rata (Duffy y col., 1981; Hesse y col., 1984) y/o la liberación in vitro de material proteico posterior a la despolarización química del tejido hipocámpal con 50 mM de K^+ en presencia de Ca^{++} (1.8 mM) (Thorton, 1982).

En adición a estos resultados, estudios posteriores muestran que los tejidos endocrinos, como las células alfa y beta del páncreas de rata y humano, secretoras de glucagón e insulina, expresan en la superficie membranal una inmunoreactividad específica a antígenos peptídicos correspondientes a insulina, el péptido C, glucagón y cromograninas, en los sitios donde se produce el fenómeno de fusión y exocitosis de gránulos secretorios (Lars-Inge y col., 1989)

Además de los estudios de liberación neuronal de macromoléculas, diferentes estudios realizados a partir de preparaciones de cultivo de diferentes líneas tumorales de glía (v.g., glioma-C6, astrocitoma) y líneas celulares híbridas (v.g., neuroblastoma), demuestran la liberación al medio extracelular de un grupo extenso de glucoproteínas, incluyendo el factor de crecimiento neural, NGF (ver más adelante en sección de neurotrofinas) (Arenander y De Vellis, 1980, 1981 a y b) que poseen la capacidad de promover el crecimiento y diferenciación de neuronas sensoriales (Truding y col, 1975, Schubert 1978, Salton y col., 1983, Yavin y col., 1986).

5.- Cromograninas

El estudio de la liberación de proteínas tiene sus orígenes desde la década de los 60's, donde diversos grupos de investigación habían reportado la liberación de componentes proteicos en células cromafines de la médula adrenal, que en forma simultánea con la liberación de catecolaminas estas eran almacenadas en los gránulos cromafines y liberados por exocitosis, mediante la aplicación de acetilcolina (Banks y col., 1965; Kirshner y col., 1967). Estas proteínas de variables masas

moleculares han sido referidas y conocidas en la literatura como *cromograninas* (Blaschko y col., 1967; Winkler y Fischer-Colbrie, 1992). Estas sustancias bioactivas están representadas por un grupo heterogéneo de moléculas de alta masa molecular, donde la Cromogranina A (De Potter y col., 1969, 1970) y la Dopamina Beta-Hidroxilasa (DBH) (Viveros y col., 1968) parecen conformar el paquete proteico intravesicular de mayor abundancia. Subsecuentemente diversos estudios han podido confirmar la co-liberación inducida (por estimulación eléctrica del tejido) de catecolaminas en terminales adrenérgicas, conjuntamente con la familia de Cromograninas y DBH, en forma dependiente de la presencia de Ca^{++} en el medio de incubación (De Potter y col., 1969). Estas moléculas son almacenadas en vesículas "grandes" (LDCV) conjuntamente con norepinefrina (NE), representando el 87% de las proteínas ácidas solubles en el espacio intravesicular, conjuntamente con la DBH (fracción representada por el 4% del contenido vesicular), péptidos bioactivos, derivados de sus precursores proteicos específicos (v.g., encefalinas, el péptido, NPY), (que conforman el 1% del contenido soluble vesicular) (Fischer-Colbrie y col., 1989; Geffen y col., 1974).

Si bien las técnicas inmunohistoquímicas, han facilitado la detección inmunoreactiva de las cromograninas en diferentes tejidos neuroendocrinos (v.g., sistema de neurosecreción interna) (Simon y col., 1989) en áreas neuroanatómicas y sistemas neuronales específicos del SNC de mamíferos (Weiler y col., 1990; Muñoz y col., 1990; Mahata y col., 1993, Kirschmair y col., 1995; Majdoubi y col., 1996;) así como su presencia en el compartimento ventrículo-cisternal del cerebro de mamíferos (v.g., LCR) (O'Connor y col., 1993; Elder y col., 1998); la aplicación de las técnicas de radioinmunoensayo (v.g., RIA, por sus siglas en inglés) han favorecido el diagnóstico tumoral de diferentes neoplasmas malignos de origen endocrino y neuroendocrino, utilizando los diferentes familias de cromograninas (v.g., cromogranina A, Cromogranina B y Secretogranina III/ Cromogranina C) como marcadores tumorales selectivos para diferenciar líneas tumorales neuroendocrinas que secretan en abundancia estos productos proteicos escindidos de sus respectivas moléculas precursoras. Además, estas moléculas son altamente utilizadas como excelentes marcadores intracelulares de las etapas de maduración, segregación y transporte de los gránulos de secreción y por tanto utilizados como marcadores de la ruta de secreción exocítica (Simon y col., 1989; Fischer-Colbrie y col., 1995). Sobre este lineamiento, se ha observado que la fusión de proteínas recombinantes, como la cromogranina B (hCgB) y la proteína fluorescente-GFP (hCgB-GFP) en células transfectadas (v.g., S65T, EGFP) son capaces de segregar la cromogranina B en vesículas endocíticas asociadas con el marcador proteico vesicular (sinaptogamina I), siendo el contenido vesicular liberado bajo estimulación química de las células con 50 mM de K^+ , en presencia de Ca^{++} ; evento que resulta ser similar a lo observado cuando se estimula químicamente células tumorales como la línea tumoral neuroendocrina, PC12 (Kaether y col., 1997).

Las cromograninas representan una familia de precursores proteicos, cuya regulación de su transcripción a nivel celular ha sido recientemente descrita en tejidos

neuroendocrinos (Canaff y col., 1998) y en el tejido nervioso (Shen y Gundlach, 1998) de donde se han aislado, identificado y caracterizado respectivamente, una gran familia de neuropeptidos bioactivos como la secretoneurina (péptido derivado de la cromogranina C)(Kirschmair y col., 1993); el péptido PE-11 (derivados de la Cromogranina B) (Kroesen y col., 1996) y péptidos bioactivos derivados de la Cromogranina A (Vasostatina, β -granina, pancreastatina, el péptido GE-25) (Kirschmair y col., 1995; Cohn y col., 1995) y otra nueva proteína obtenida del mismo precursor (NESP55) (Lovisetti-Scamihorn y col., 1999) parecen procesarse en forma diferencial durante el transporte axonal de sus precursores (figura 7).

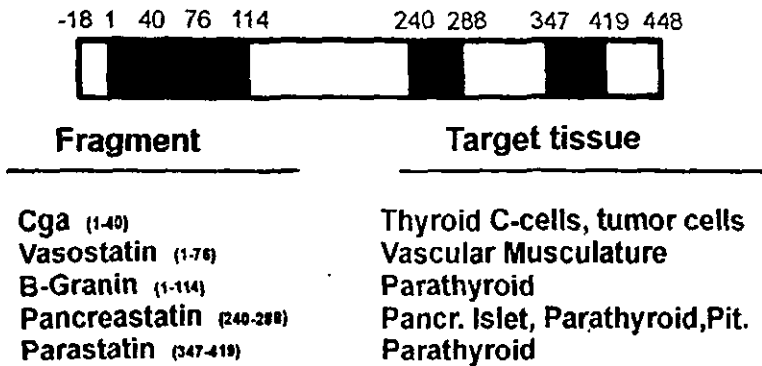


Figura 7.- Caracterización Molecular de la Cromogranina A.- Representación esquemática del fragmento polipeptídico de la Cromogranina A, y péptidos caracterizados que se derivan del procesamiento proteolítico intravesicular de esta preprohormona en células neuroendocrinas y células neuronales. Diferentes fragmentos peptídicos localizados en la preprohormona han sido aislados, identificados (columna izquierda, fragments) y caracterizados funcionalmente con respecto a las actividades biológicas que estos fragmentos peptídicos expresan y ejercen en los tejidos endocrinos blanco afectados (columna derecha, target tissue) (Kirschmair y col., 1995)

6.-

Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa

a).- **Introducción.-** La acetilcolinesterasa representa la proteína mas estudiada e investigada dentro del amplio espectro de macromoléculas identificadas, aisladas, clonadas y caracterizadas molecularmente tanto en especies de vertebrados (Randall,1994) como de invertebrados (Lewis y col., 1982; Toutant, 1989; Meyer y col., 1998). La acetilcolinesterasa (AChE; E.C. 3.1.1.7) es la enzima involucrada en la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh) y tanto esta como la butirilcolinesterasa (BuChE; E.C. 3.1.1.8) existen en los tejidos (membranas plasmáticas) y líquidos biológicos (plasma y LCR) como polímeros en dos conformaciones estructurales, como *proteínas anfifílicas simétricas*, formados por la asociación de distintas subunidades catalíticas globulares; G₁, G₂, G₄ las cuales son extraídas con soluciones amortiguadoras de baja fuerza ionica y/o con detergentes iónicos cuando se encuentran insertadas o ancladas a membranas plasmáticas a través de un glucolípido que contienen fosfatidilinositol asociado a un fragmento peptídico hidrofóbico de 20 kDa (Fuentes y col., 1988, Inestrosa y Perelman, 1989; Spinedi y col., 1993). La síntesis y transcripción diferencial del precursor proteico parece ser regulada por péptidos pequeños como es el caso del dipéptido, Glicil-L-Glutamina (Koelle,1988).

Las formas globulares se encuentran ancladas a proteínas de colágena de la matriz extracelular, a través de proteoglicanos extracelulares, formando parte de proteínas mas complejas (Insertos y Perelman, 1989; Toutant, 1989), esto es, como estructuras *proteicas asimétricas* del tipo A₁, A₂, A₁₂.(Brimijoin, 1983; Fadic e Inestrosa, 1989; Toutant y col., 1990; Saez-Valero y col., 1993). Estas proteínas son ensambladas en el aparato de Golgi (Rotundo, 1984) transportadas y secretadas al espacio extracelular (figura 8 y 9) y asimismo depositadas en las terminales sinápticas de la placa neuromuscular. La estructura conformacional que adoptan estas macromoléculas en el espacio intercelular es importante, pues de esta conformación tridimensional se determina la inducción, la agregación y expresión del receptor colinérgico (ACh-R) en las terminaciones multisinápticas que se establece en la placa neuromuscular (Wallace y col., 1985).

Asimismo, se ha demostrado que las diferentes formas globulares (v.g., 4S, G₂; 10S, G₄) tanto de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasas (3S,10S), se encuentran altamente distribuidas conjuntamente con la expresión inmunoreactiva de péptidos bioactivos y factores de crecimiento (v.g., Factor de Crecimiento Neural, NGF) (Peterson y col., 1994), en diversas áreas anatómicas del cerebro adulto y fetal de mamíferos (Planas y col., 1994; Schlaggar y col., 1994; Yao y Godfrey, 1998; Darvesh y col., 1998) incluyendo el cerebro humano (Mesulam y Geula, 1994), y el tejido nervioso en regeneración (Pokay y Grant, 1984; Engel y Kreutzberg., 1986; Layer y col., 1987; Millar y Chubb., 1987; Brimijoin y col., 1990; Geula y col., 1993; Pogorelov y col., 1993).

Particularmente, se ha localizado la expresión de diferentes isoformas de AChE, en las terminales sinápticas neuronales (Rotundo y Carbonetto, 1987) y en vesículas secretorias en la glándula adrenal (Gratzl y col., 1981) donde previamente diversos autores han detectado la liberación inducida (con alta concentración de K^+ , en presencia del ion Ca^{++} en el medio de incubación) de una isoforma enzimática soluble (fracción V) en perfusados del nervio frénico y nervio esplénico (Chubb y Smith, 1975).

Más aún, en el tejido nervioso se ha colocalizado la expresión de esta fracción isoenzimática con el sistema neuronal de captura de ACh a nivel de la terminal presináptica (Raiteri y col., 1986). Diversos estudios han confirmado que la expresión celular de las diferentes isoformas de las colinesterasas que expresan las células neuronales y musculares esta mediada por diferentes formas de excisión (splicing) de múltiples RNAm (Schumacher y col., 1988) que codifican las diferentes isoformas celulares de AChE, cuyos transcritos parecen provenir de una sola copia genómica (Schumacher y col., 1988; Rotundo y col., 1988; Li y col., 1991). A través de las técnicas de hibridización *in situ* se ha podido demostrar la amplia distribución de los RNAm que codifican la diversidad de isoformas de AChE. en el tejido neuronal de mamíferos superiores (v.g., mono rhesus y humano) (Landwehrmeyer y col., 1993) y en diversas líneas tumorales de humano (Karpel y col., 1994).

Asimismo, se ha demostrado que la forma predominante de acetilcolinestasa y butirilcolinestasa, que circulan en líquidos biológicos es la forma globular G_4 , en una relación de 1:0.5, respectivamente (Attack y col., 1987).

Finalmente, diversos trabajos experimentales pioneros, realizados en su mayoría en explantes de tejido y/o cultivos primarios de los mismos; han establecido y demostrado, la ruta de secreción de las diferentes isoformas de AChE; su inserción en la membrana plasmática en cultivo de células musculares (Rotundo y Fambrough, 1980; Rossi y Rotundo., 1992) la inducción de la síntesis enzimática en células musculares, por peptidos bioactivos secretados por las motoneuronas (v.g., Calcitoni Gene Related-Peptide, CGRP) (Choi y col., 1998), así como la secreción fisiológica basal y estimulada (50 mM de K^+ o carbacol) de AChE (G_4) conjuntamente con la liberación inducida de norepinefrina (NE) a partir del cultivo primario de la línea tumoral adrenomedular, PC12, en presencia de inhibidores de esterases (v.g., paroxón, fosfolina) (Mizobe y col., 1984; Schweitzer y Kelly, 1985; Schweitzer, 1993), demostrándose adicionalmente la presencia de distintas isoformas de AChE en vesículas de secreción como son los gránulos cromafines (Bon y col., 1990).

b).- Secreción neuronal de Acetilcolinestasa (AChE). Observaciones iniciales revelaron que la AChE y colinesterasas inespecíficas (ChE) unidas a membranas (Silver, 1974) podían ocurrir en formas solubles (Chubb y Smith, 1975, a y b). Previos estudios habían confirmado que la AChE se encontraba en espacios extracelulares tanto de la placa neuromuscular y en el sistema nervioso central (Kasa, 1968; Kreutzberg y Töth, 1974, Kreutzberg y Kaiya, 1974). Una tercera parte de la fracción de AChE intracelular, recién sintetizada parece ser incorporada a membranas

plasmáticas (Rotundo y Famborough, 1980). Estos antecedentes conjuntamente con la observación de la presencia de colinesterasas en el LCR (Plattner, 1930, Davson, 1970), permitió caracterizar por estudios electroforéticos, la existencia de 5 fracciones solubles isoenzimáticas de colinesterasas (ChE) resultando que una sola iso especie enzimática (de baja movilidad electroforética) era capaz de liberarse en forma fisiológica del tejido neuronal (Yaksh y col., 1973; Chubb y Smith 1975) El plasma solo contiene colinesterasas inespecíficas por lo que su origen a partir de este compartimento era dudoso (Chubb y Smith, 1975). Chubb y Smith reportan por vez primera que la fracción isoenzimática V sufre un incremento considerable en el compartimento ventricular del cerebro de mamíferos posterior a la estimulación eléctrica del tejido nervioso periférico (Chubb y Smith, 1974; Fuenmayor y col., 1976). Estos autores muestran que ésta fracción se co-libera conjuntamente con Ach, misma que es capaz de liberarse bajo estimulación química del tejido adrenal cuando se aplica un medio de incubación que contiene una alta concentración del ion K^+ y Ca^{++} (Chubb y col., 1976). Asimismo, estos estudios hacen entrever que proteínas marcadoras del compartimento intracelular, como es la enzima Lactato Deshidrogenasa, LDH, no se incrementa con la estimulación del tejido (Chubb y Smith, 1975b).

En extensión a los hallazgos mencionados anteriormente, diversos estudios *in vitro*, han corroborado que la liberación de AChE durante la estimulación eléctrica de la preparación del nervio frénico-hemidiafragma, es dependiente de la presencia de Ca^{++} exógeno e inhibida por la aplicación exógena del ion Mg^{++} (Skau y Brimijoin, 1978).

Por otro lado, la administración sistémica del clorpromazina (fármaco utilizado para aumentar la actividad colinérgica endógena) produce un incremento sustancial fronto-caudal en la actividad de esta enzima en el LCR de especies mamíferas, datos que apoyan el posible origen neuronal de la liberación de la AChE (Bareggi y Giacobanni, 1978). Este incremento ventriculo-cisternal de AChE inducida por este fármaco, es bloqueado por atropina, datos que permiten sugerir que las neuronas que integran diferentes sistemas de neurotransmisión en áreas anatómicas profundas del cerebro, como las células dopaminérgicas de la sustancia nigra (pars compacta), pudiesen ser sensibles a la acción de estos fármacos, y ser las responsables de las variación de la concentración de AChE en el LCR (Greenfield y col., 1978).

Figura 8. Representación esquemática de las diferentes formas moleculares de la AChE y su anclaje a las membranas plasmáticas (Koelle, 1988)

La figura superior (a) muestra la disposición y estructura de las formas asimétricas de la Acetilcolinesterasa y su anclaje a la matriz extracelular, mediante la interacción de la cola de colágena (collagen-like tail) con las cadenas laterales como son los glucosaminglucanos presentes en moléculas proteicas que conforman la matriz extracelular (proteoglucanos).

La figura inferior (b) muestra la inserción de las isoformas dimericas de la Acetilcolinesterasa (AChE) a la membrana plasmática a través del complejo glucolipido-fofatidilinositol localizado en la porción carboxilo terminal de las subunidades catalíticas (figura izquierda). La isoforma tetramérica del a AChE parece anclarse a la membrana plasmática mediante un polipéptido de 20 kDa. Se esquematiza la localización aproximada del sitio sensible a la acción proteolítica de la proteinasa K (prot. K) que escinde enzimáticamente este fragmento polipeptídico (figura derecha).

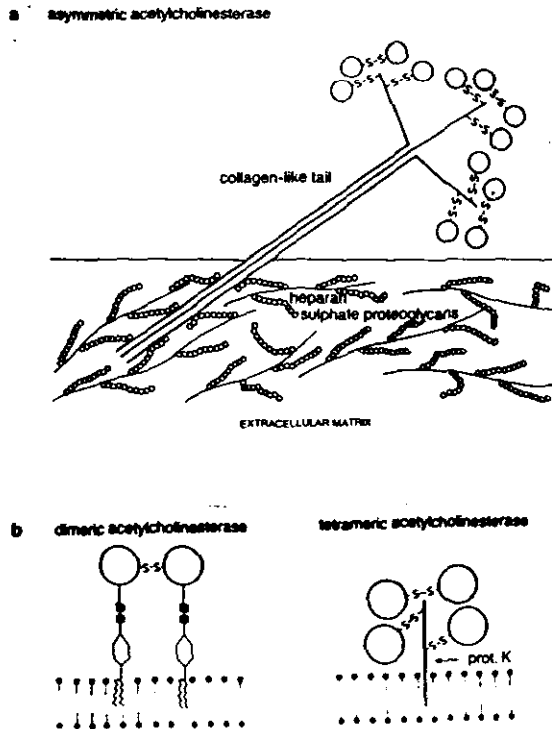
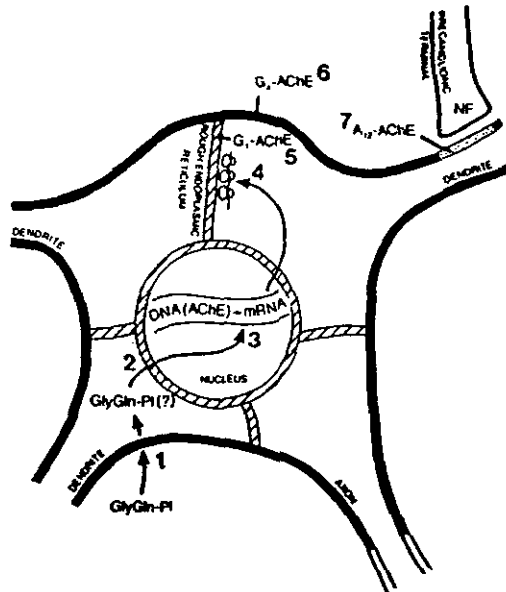


Figura 9

Hipótesis sobre la regulación de la síntesis de AChE por el dipéptido Gly-Gln en neuronas adrenérgicas del ganglio cervical superior.

El dipéptido Gly-Gln en combinación con un factor neurotrófico (PI) liberado de la terminal presináptica atraviesa la membrana plasmática (1) y la membrana nuclear (2) donde en combinación con el factor trófico o libre induce la transcripción del gen de AChE (3). El RNAm transcrito es traducido en el rER (4), sintetizándose la forma monomérica G_1 de la AChE (5). Una fracción monomérica es transportada a la membrana neuronal (dendritas y cuerpo celular) donde se ensambla a una forma globular tetramérica G_4 (6) y otra fracción de esta es depositada en la sinápsis como una proteína compleja (A_{12}) asociada a colagéna (7). En fibras colinérgicas preganglionares la forma tetramérica de la AChE es la que predomina en las prolongaciones axónicas mas no en axones adrenérgicos (Koelle, 1988).



Los estudios que hicieron posible determinar el origen neuronal de la secreción de AChE fueron ampliados con la implementación de la técnica de perfusión intracerebral "push-pull" (ver capítulo referente a la Neuroquímica *in vivo*). Este procedimiento permitió localizar con mayor precisión las áreas neuroanatómicas involucradas en la secreción fisiológica de la AChE. Inicialmente, diversos trabajos experimentales observaron que la estimulación eléctrica de áreas específicas del cerebro de mamíferos (V.G., gato) como el núcleo estriado y la sustancia nigra mesencéfalica inducía un incremento significativo de los niveles basales de AChE específica (fracción V) en el LCR (Greenfield y Smith, 1979). Mediante la inserción intracerebral de cánulas de perfusión simultáneas en el núcleo caudado y la sustancia nigra, Greenfield y col. demostraron la liberación espontánea e inducida de AChE (mediante la infusión local de medios de perfusión, conteniendo altas concentraciones del ion K^+ , en ambas regiones subcorticales (Greenfield y col., 1980). Estos hallazgos experimentales, hacían evidente que la liberación estriato-nigral de AChE está estrechamente relacionada con el sistema neuronal dopaminérgico, resultados que eran sustentados por las observaciones inmunohistoquímicas que revelaban que las neuronas dopaminérgicas además de mostrar una inmunoreactividad positiva a DA, mostraban la expresión inmunoreactiva a AChE (Butcher y Woolf, 1982) en las membranas presinápticas de fibras aferentes nigro-estriatales (Lehman y Fibigier, 1978).

Con el fin de determinar el grado de participación del sistema nigro-estriatal en la liberación de AChE, mismos autores demuestran que la lesión del tracto dopaminérgico nigro-estriatal con 6-hidroxi-dopamina, reduce dramáticamente la liberación espontánea de la isoenzima en un 70 % del valor control promedio en el estriado de gatos conjuntamente con la ausencia de una respuesta de liberación de la misma por alto K^+ . Más aun, la depleción obtenida en el contenido tisular de DA en la sustancia nigra; reforzaba la hipótesis sobre el origen de la liberación de la AChE a partir de las terminales presinápticas de las fibras aferentes dopaminérgicas nigro-estriatales (Greenfield y col., 1983 a y b). En extensión a estos resultados, diversos datos experimentales confirman que la liberación espontánea de AChE y DA son incrementadas tanto en el estriado como en la sustancia nigra ipsilateral cuando se infunden localmente fármacos agonistas dopaminérgicos como la anfetamina, efectos que resultan no alterar la liberación espontánea de ChE inespecíficas en ambas estructuras (Leviel y col., 1979; Greenfield y Shaw, 1982).

Por otro lado, el hecho que la administración local con TTX (bloqueador selectivo de canales de Na^+ y por ende del impulso nervioso) no reduce significativamente la liberación espontánea de la isoenzima y DA en la sustancia nigra, en tanto que la liberación de ambas moléculas se incrementa con la presencia de alto K^+ (50 mM) y Ca^{++} (2.0 mM) en el medio de perfusión; permitió sugerir el posible origen dendrítico de la liberación de la AChE en las neuronas dopaminérgicas (Greenfield 1984a). En apoyo a estas observaciones experimentales, diversos estudios de inmunohistoquímica han demostrado la translocación de AChE del soma neuronal a dendritas y su secreción al medio extracelular a partir de motoneuronas de

mamíferos, donde ésta es depositada en la membrana basal de capilares adyacentes (Kreutzberg y Töth, 1974). Por tanto, la liberación de la AChE parece no solo derivarse de terminales presinápticas de axones aferentes dopaminérgicos en el estriado, sino también a partir de dendritas y cuerpos celulares de neuronas nigro-estriatales, donde su liberación espontánea no es afectada por la despolarización química o eléctrica del tejido nigral. Estos datos sugieren en un contexto general, que su presencia en el medio extracelular no parece estar supeditada a un proceso secretorio dependiente de respuestas moduladoras asociadas a señales de actividad neural específicas (Greenfield, 1984a). El hecho que una alta proporción de la isoenzima se encuentre a nivel presináptico, y/o asociada a membrana; sugiere que la poza liberable de la proteína no está completamente relacionada únicamente con la inactivación de ACh (Greenfield, 1984b). Aunque diversos estudios han propuesto que la AChE liberada de terminales axónicas de nervios periféricos, pudiese ser relevante como "material trófico" para mantener la integridad estructural de la neuronas (Hines y Garwood, 1977) y/o las estructuras de inervación (Wallace, 1985), fenómeno que pudiese darse para las neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales (Greenfield, 1984a) como se ha demostrado su posible papel como factor neurotrófico en el desarrollo y extensión de neuritas en neuronas dopaminérgicas extraídas del cerebro de rata de 1 día de edad posnatal (Jones y col., 1995).

Interesante resulta el hecho que estructuras no colinérgicas similares a la sustancia nigra sean capaces de liberar AChE en forma espontánea e inducida, como es el caso de la corteza cerebelar, donde la aplicación local de concentraciones despolarizantes del ion K^+ (30 mM) incrementan la liberación espontánea de AChE al medio extracelular en forma dependiente de Ca^{++} , tanto en la corteza cerebelar ipsilateral como contralateral; misma que no es afectada por agentes colinomiméticos (v.g., carbacol) evidencias experimentales que ha permitido sugerir que los eventos neuronales polisinápticos son capaces de regular en forma fisiológica la liberación de la isoenzima en ambas cortezas cerebelares (Appleyard y col., 1988). Asimismo, para evaluar el sistema de perfusión, y la viabilidad del tejido durante la estimulación química del tejido estriato-pallidal con agentes despolarizantes (K^+ 50 mM) Bayón y col., observaron un incremento importante en la liberación de AChE (134-240 %) sobre el nivel basal en regiones cerebrales subcorticales (v.g., estriado y globus pallidus) (Bayón y col., 1985, 1986).

c).- Liberación de neuronal de AChE: Estudios *in vitro*. La secreción constitutiva y regulada de AChE ha sido estudiada *in vitro* en diferentes líneas celulares tumorales de origen neuroendócrino así como en explantes de tejido neuronal fetal (Schweitzer, 1993; Biagonni y col., 1995). A partir de cultivos primarios de neuronas de medula espinal de pollo, del híbrido tumoral de roedor, el neuroblastoma de 108CC15 y el neuroblastoma N18TG2, se ha podido estimar que la fracción de AChE secretada por las neuronas espinales es predominantemente la isoforma G_4 representando el 90% de la actividad ectocelular de la enzima. Asimismo, la secreción de AChE en las líneas tumorales no parece afectarse cuando se exponen a un tratamiento con drogas que alteran la estructura fibrilar del citoesqueleto (v.g. citocalasina B), pero si en presencia

de drogas que alteran el transporte intracelular de vesículas secretorias a la superficie submembranal (v.g., nocodazol), observándose que esta droga per se, reduce la secreción de la enzima en un 50%; datos que sugieren el requerimiento de este transporte intracelular de la enzima sintetizada *de novo* previo a su secreción (Biagoni y col., 1995). Estos estudios, reflejan que independientemente de la expresión de la actividad ectocelular de AChE en la membranas plasmáticas de las células tumorales, la aplicación de altas concentraciones del ion K^+ en el medio de incubación (100mmol/L) o agonistas colinérgicos (carbacol, 100mmol/L) producen un incremento sustancial ($\approx 200\%$) en la liberación de la enzima con respecto a su liberación basal, liberación que resulta ser dependiente de la presencia del ion Ca^{++} medio de incubación (Biagoni y col., 1995). Asimismo extractos de tejido muscular embrional de pollo, parecen incrementar en un 200 % la secreción espontánea de AChE neuronal así como también la actividad intracelular de la enzima tanto en las neuronas espinales (58%) como en el hibridoma 108CC15 (57%). Sin embargo, los mismos extractos musculares reducen la secreción de la enzima en un 50 % e incrementan solo un 10 % la actividad celular de la enzima en la línea tumoral N18TG2 (Biagoni y col., 1995).

d).- Funciones no colinérgicas de Acetilcolinesterasa.- Los hallazgos experimentales que han permitido elucidar los mecanismos fisiológicos que regulan la liberación de la isoenzima y el neurotransmisor dopaminérgico, dopamina (DA); a partir de terminales axónicas y/o dendríticas, conjuntamente con la demostración inmunohistoquímica sobre la ausencia de un sistema de neurotransmisión colinérgica efector en la sustancia nigra, ha permitido plantear el origen exclusivo de la enzima a partir de las células dopaminérgicas nigro-estriatales (Greenfield, 1984b Mercer y col., 1979; Liesli y col., 1980;) así como posibles nuevas funciones intrínsecas de esta enzima sobre la actividad neuronal de estas células (Greenfield, 1984b; 1991).

Bajo este contexto, estudios posteriores han mostrado que la aplicación exógena de concentraciones fisiológicas de la enzima similares a las estimadas en el espacio extracelular, inhiben la tasa de disparo neuronal de las vías nigro-estriatales, efecto no observado con la aplicación exógena de butirilcolinesterasa. Este efecto no parece ser mediado por la hidrólisis de ACh (Greenfield y col., 1981; Weston y Greenfield, 1986).

Asimismo, diversos estudios conductuales, han demostrado que la lesión unilateral de las fibras dopaminérgicas nigro-estriatales con 6-hidroxi-dopamina induce un patrón de giro en la rata en dirección contralateral al sitio lesionado (Ungerstedt, 1971), fenómeno que ha sido analizado como respuesta a un desequilibrio en el contenido tisular de DA, almacenada en las terminales dopaminérgicas en neuronas nigroestriatales (Pycocock, 1980). Estos efectos parecen ser mimetizados con la inyección local de AChE a la sustancia nigra, en animales no lesionados, efecto que se extiende por tres semanas ante la aplicación de una dosis única de la isoenzima (Greenfield y col., 1984b). Asimismo, se ha observado que una proteasa asociada a la AChE membranar, con actividades de tipo carboxipeptidasa y tipo tripsina, parecen

funcionar como una enzima denominada como *APP-secretasa*, que escinde en condiciones normales una proteína ($\beta A4$) a partir de un precursor proteico transmembranal (AAP), presente en los depósitos amiloideos de pacientes con enfermedad de Alzheimer, depósitos que parecen contener o asociarse con la enzima AChE (Small y col., 1991). Adicionalmente, se observó que la incubación de AChE en presencia de cromogranina A, extraída y purificada de los gránulos cromafines de bovino; es capaz de escindir enzimáticamente y producir diferentes fragmentos peptídicos de bajo peso molecular derivados de la cromogranina, similar al efecto de enzimas tipo tripsina (Small y col., 1986). Independientemente de que estas actividades no esterásicas se deban a la presencia de enzimas contaminantes asociadas durante la purificación de la isoenzima (Checler y Vincent, 1989), diversos estudios experimentales han demostrado la existencia de múltiples actividades biológicas que parecen expresar estas enzimas (Balasubramanian y Bhanumathy, 1993) (ver tabla adjunta):

TABLA 1. Actividades biológicas propuestas para las colinesterasas

<u>Actividad Biológica</u>	<u>Colinesterasas involucradas</u>
Actividad Aryl-acrilamidasa sensible a aminas	AChE, BChE
Actividad tipo Metallo-carboxipeptidasa	AChE, BChE
Hidrólisis de Cocaína	BChE
Diferenciación de células neuronales	AChE, BChE
División celular y tumorigénesis	AChE, BChE
Funciones específicas en la sustancia nigra: (Funciones tróficas y apertura de canales iónicos, K ⁺)	AChE
<u>Interacción célula - célula</u>	<u>AChE, BChE</u>

(Balasubramanian y Bhanumathy, 1993)

En resumen, la AChE parece no solo ejercer acciones moduladoras en las neuronas nigro-estriatales, donde la secreción dendrítica de la enzima pudiese regular distintas funciones locomotoras en el animal *in vivo* (Greenfield, 1991), sino que además la enzima liberable, parece contener una actividad de endopeptidasa, ejercer efectos tróficos sobre neuronas durante el desarrollo, crecimiento y diferenciación del SNC de mamíferos y regular en forma indirecta la difusión de iones al axoplasma a través de la apertura específica y selectiva de canales iónicos membranales (Greenfield, 1984, 1991; Appleyard, 1992; Balasubramanian y Bhanumathy, 1993; Jones y col., 1995).

7.- Liberación de Enzimas : Deshidrogenasa Láctica y Dopamina- β -hidroxilasa.

a).- Liberación de Deshidrogenasa láctica (LDH).- Esta enzima de origen citoplasmático, es una proteína soluble, tradicionalmente utilizada como "enzima de escape" y por tanto útil en el señalamiento "bioquímico" de daño tisular. Diversos autores han empleado la medición de su actividad en perfusados cerebrales con el fin de registrar las variables metodológicas durante las sesiones de perfusión, como el grado de lesión del tejido perfundido y la contaminación plasmática del mismo como consecuencia de la extravasación y/o ruptura de vasos sanguíneos (Greenfield y col., 1980; Greenfield y Shaw, 1982; Greenfield y col., 1983b). La especificidad que ofrece esta enzima como marcador bioquímico de daño tisular ha sido muy objetable.

Observaciones experimentales previas, han demostrado que la activación del sistema aferente nigro-estriatal posterior a la aplicación nigral de anfetamina, no induce incrementos en la liberación de LDH a perfusados tanto en esta estructura como en el estriado ipsilateral (Greenfield y Shaw, 1982). En tanto que la administración local de alto K^+ produce un incremento en la tasa de liberación espontánea de esta enzima en la sustancia nigra y un decremento simultáneo de ésta en el estriado ipsilateral (Greenfield y col., 1983b), la lesión unilateral de la vía nigro-estriatal con 6-OH-DA, produce un decremento significativo en la liberación espontánea de ésta en la sustancia nigra y una reducción del 50 % del valor obtenido de su liberación inducida por alto K^+ en el estriado ipsilateral (Greenfield y col., 1983b). Estos resultados han permitido sugerir que la liberación de la enzima en el estriado proviene de compartimentos subcelulares en las terminales nerviosas dopaminérgicas y que el incremento de su liberación neuronal observado es proporcional y dependiente de la actividad y frecuencia de disparo neuronal de esta vía de transmisión dopaminérgica (Greenfield y col., 1983b).

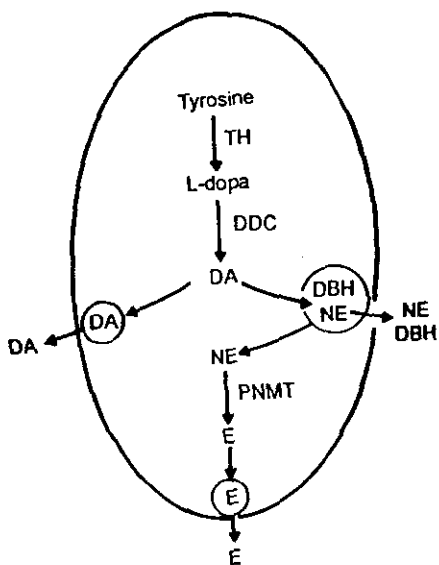
En adición a lo expuesto, los estudios experimentales que han demostrado la co-liberación de la LDH conjuntamente con otras enzimas, como la aminopeptidasa (fracción isoenzimática de movilidad electroforética rápida), han permitido sugerir que aunque estas isoenzimas pudiesen estar co-almacenadas en las mismos compartimentos subcelulares en las neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales, ambas enzimas pudiesen tener una gran utilidad como trazadores bioquímicos indicadores de lesión tisular y por tanto deben ser utilizados con cautela cuando son utilizados para evaluar en adición con otros marcadores citoplasmáticos el daño tisular pertinente durante las sesiones de perfusión *in vivo* (Greenfield y col., 1983b). Asimismo, esta enzima conjuntamente con la liberación de proteasas inespecíficas ha sido de utilidad para evaluar la viabilidad del tejido neuronal y las respuestas de liberación de péptidos bioactivos y proteína endógena durante la estimulación química

del tejido durante las sesiones de perfusión cerebral en el animal *in vivo* (Bayón y col., 1985, 1986).

b).- Dopamina Beta-Hidroxilasa.- Inicialmente, Kirchner reportó que la DA no sólo es transportada en gránulos cromafines en las células neuroendocrinas de la médula adrenal, sino que este neurotransmisor era metabolizado y transformado a norepinefrina (NE) por actividades enzimáticas específicas (Kirchner, 1962). Este estudio, permitió posteriormente identificar la enzima catecolaminérgica responsable de la conversión DA-NE, la Dopamina- β -hidroxilasa (E.C.1.14.17.1), localizándola por ensayos bioquímicos e inmunoenzimáticos en vesículas sinápticas (SDCV) en neuronas noradrenérgicas y gránulos de neurosecreción (LDCV) en tejidos neuroendocrinos (médula adrenal) conjuntamente con la norepinefrina. Asimismo, estudios posteriores demostraron que la estimulación eléctrica o química del tejido, inducía la liberación conjunta de la enzima, cromograninas y NE (Viveros y col., 1968; Geffen y col., 1969; De Potter y col., 1970; Smith y col., 1970, Matsumoto y col., 1987) (figura 10). Mas aun, los tejidos de neurosecreción y líneas tumorales derivadas (feocromocitoma medular, PC12), expresan dos isoformas de la enzima; una fracción soluble (sDBH), conformada por una subunidad de 70 kDa, misma que es almacenada en el interior de los gránulos cromafines y secretada bajo los mecanismos de regulación exocítica; y otra fracción membranal (mDBH), conformada por dos subunidades proteicas transmembranales de 70 y 75 kDa, cuyo sitio activo parece estar localizado hacia el compartimento intravesicular, es reciclada posterior a la exocitosis del material soluble intravesicular (Joh y Huang, 1986; Taylor y Fleming, 1989).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la enzima, deducido mediante la identificación y clonación de diversos cDNAs, aislados del feocromocitoma de bovinos y humanos, han permitido demostrar la expresión de un fragmento peptídico hidrofóbico en el extremo amino terminal de la proteína precursora, que determina el anclaje membranal de la enzima mediante la interacción no covalente con fosfolípidos (v.g., fosfatidilserina) que integran la membrana de las vesículas exocíticas; mecanismo que parece depender del el pH intravesicular (Taylor y Fleming, 1989). Estos resultados han permitido presuponer que las dos isoformas enzimáticas codificadas en un sólo RNAm, son resultado de las modificaciones postraduccionales que sufre la enzima después de su síntesis ribosomal, que determinan por un lado la escisión del fragmento hidrofóbico del extremo amino terminal de una isoforma (sDBH) y su liberación subsecuente, y por otro lado el anclaje membranal de la otra isoforma (mDBH) (Taylor y Fleming, 1989). Asimismo, diversos estudios experimentales, han revelado la co-localización inmunohistoquímica de estas fracciones isoenzimáticas en vías neuronales adrenérgicas en el sistema nervioso de vertebrados e invertebrados, en combinación con diferentes péptidos bioactivos, proteínas como la GAP-43, que resultan estar co-almacenados en diferentes tipos de vesículas exocíticas (Schwarzenbrunner y col., 1992; Bailhache y Bathazart, 1993; Berger y Alvarez, 1994; Wotherspoon y Prestley, 1995)

Figura 10- Síntesis, almacenamiento y liberación de catecolaminas - En las neuronas dopaminérgicas (DA), la dopamina es liberada a partir de vesículas correspondientes. Asimismo, en neuronas noradrenérgicas (NE), la norepinefrina es sintetizada a partir de DA, concentrada y almacenada en vesículas que contiene la dopamina-beta-hidroxilasa (DBH). Durante la exocitosis tanto la EN como la DBH son liberadas al medio extracelular (Tong y Onyou, 1989)



8.- Neurotrofinas

a).- Introducción.- Las *neurotrofinas* representan un grupo heterogéneo de proteínas dimericas, que comparten características estructurales y funcionales en común, particularmente en lo referente al efecto de influenciar y promover el desarrollo y la regeneración del sistema nervioso de vertebrados e invertebrados. Durante más de cuatro décadas diferentes estudios experimentales han permitido establecer las bases biológicas y moleculares que ejercen los diferentes factores tróficos para favorecer y establecer la sobrevivencia de diversos grupos neuronales, en particular las neuronas de tipo sensorial, a lo largo de la ontogénesis del sistema nervioso, y posterior a su diferenciación posnatal (Lewin y Barde, 1996). En general, estas moléculas proteicas, no están limitadas a prevenir la muerte celular, evento programado en diversos grupos neuronales durante la embriogénesis del sistema nervioso. Una extensa familia de factores neurotróficos han sido recientemente aislados, identificados y caracterizados funcional y molecularmente, iniciándose con el descubrimiento y aislamiento del factor de crecimiento neural (NGF) cuya identificación y caracterización inicial (Levi-Montalcini, 1960), permitió la caracterización posterior de un grupo adicional de moléculas con actividad neurotrófica y de un grupo de receptores específicos de alta afinidad y selectividad que median las actividades biológicas de estos ligandos proteicos (Lewin y Barde, 1996).

b).- Neurotrofinas y sus receptores.- A través de la biología molecular, las técnicas de recombinación genómica y la generación de anticuerpos específicos, se ha podido determinar tres grupos de genes que codifican en los vertebrados y en especies marinas, diversos grupos de proteínas tróficas (v.g., factor de crecimiento glial; GDNF) (Henderson y col., 1994); conformados por homodímeros naturales y heterodímeros artificiales (BDNF-NT-3) (Acklin y col., 1993; Jungbluth y col., 1994) como son el factor neurotrófico derivado del cerebro, *BDNF* (brain-derived neurotrophic factor, por sus siglas en inglés); la neurotrofina-3 (NT-3); el factor de crecimiento neural (NGF), la neurotrofina-4 (NT-4) aislado y clonado a partir del batracio, *Xenopus Laevis* (Hallbook y col., 1991) y su equivalente en especies mamíferas, la neurotrofina-5 (NT-5). Ambas moléculas designadas como neurotrofina, NT-4/5 muestran propiedades tróficas similares en diferentes líneas celulares y sistemas de ensayo *in vitro* (Davies y col 1993^a, Lewin y Barde, 1996). y la neurotrofina NT-6; (Gotz y col., 1994). Estas proteínas además de ejercer propiedades neurotróficas en diferentes sistemas celulares *in vitro* e *in vivo* (Lewin y Barde, 1996); muestran una alta homología en su secuencia de aminoácidos, lo que ha permitido suponer que el origen ancestral de proteínas secretorias como el BDNF y NT-3 surgieron previamente a la aparición del NGF en la escala filogenética (Barde, 1994) probablemente a partir de un gen ancestral codificando la neurotrofina, NT-3. (Urfer y col., 1994).

Estas proteínas neurotróficas actúan sobre tres distintos receptores celulares recientemente identificados y clonados por técnicas de recombinación genómica (Lewin y Barde, 1996) denominados; p75, trk-A, trk-B, trk-C; sobre los cuales las neurotrofinas ejercen sus propiedades de mantenimiento y sobrevivencia de las neuronas, propiedades mitogénicas sobre neuronas y neuroblastos del SNC (v.g., células ganglionares de la retina; sistema septo-hipocámpal, neuronas talámicas) y SNP de mamíferos (neuronas simpáticas del sistema ganglionar paravertebral, y neuronas sensoriales de la raíz dorsal, nervios periféricos) (Hofer y Barde, 1988; Verge y col., 1989; Hory-Lee y col., 1993; Mansour-Robaey, 1994; Cohe-Corey y Fraser, 1994; Averill y col., 1994; Barbacid, 1994; Snider, 1994; Davies, 1994; Anton y col., 1994, Ryden y col., 1995; Carter y col., 1995; Enfors y col., 1995; ; Wright y Snider, 1995; Koshlukova y col., 1996; Marty y col., 1996) y efectos sobre la regulación de la neurotransmisión y plasticidad neuronal (Lohog y col., 1993; Berninger y col., 1993; Kang y Scuman, 1995; Berzhaghi y col., 1995; Cabelli y col., 1995) y sobre la atenuación de la formación de memoria (LTP) (Korte y col., 1995); activando una compleja y variada cascada de segundos mensajeros y sistemas de señalamiento intracelular (Kaplan y Stephens, 1994). Estos eventos varían dependiendo del tipo neuronal (v.g., neuronas sensoriales, neuronas motoras) (Henderson y col., 1993; 1994; Williamns y col., 1995); el estado activo de las células (v.g., fase mitótica, postmitótica, grado de diferenciación, crecimiento, migración y/o elongación de neuritas así como de lesión) (Lewin y Barde, 1994). En extensión a estas observaciones, se ha podido demostrar que diversos factores tróficos como el NGF, GDNF, CNTF, las neurotrofinas, BDNF, NT-3, NT-4, así como múltiples glucoproteínas secretadas al LCR (v.g., el complejo SCO-RF) (Monnerie y col., 1997), mantienen el tamaño y el crecimiento neuronal a través del control homeostático acoplado el nivel de degradación de proteínas intracelulares con relación a su biosíntesis (Franklin y Johnson, 1998) y promueven la regulación de la función sináptica de las motoneuronas que inervan la placa neuromuscular, incrementando la concentración de ACh secretado por las terminales sinápticas (Liou y col., 1998), promueven la regeneración axonal de la vía nigro-estriatal en el cerebro de la rata (Hagg y Varon, 1993; Brecknell y col., 1996);

9.- Síntesis de Proteínas en el SNC de vertebrados e invertebrados.-

a).- Introducción.- Los tejidos neuroendocrinos, en particular, las células beta del páncreas, el sistema neurosecretor adrenal de diversas especies de vertebrados, y el tejido de secreción neuroendocrina de múltiples invertebrados han aportado quizá las bases fundamentales para explicar no sólo los mecanismos biosintéticos de múltiples moléculas mensajeras relacionadas en la función de la comunicación química intercelular e interneuronal, sino también la compartimentalización y segregación de dichas sustancias bioactivas en diversos tipos de vesículas endocíticas, los procesos de maduración y condensación del material soluble intravesicular, la ruta y transporte

del contenido vesicular así como el fenómeno de exocitosis del material soluble intravesicular (Palade, 1975; Rothman, 1981, Tooze y col., 1989, Burgoyne; 1990). Estos eventos celulares ocurren similarmente en las neuronas que estructuran el sistema nervioso de los diversos organismos (Nirenberg, 1970), tal como lo han mostrado diversos autores utilizando diferentes preparaciones biológicas *in vitro e in vivo* mediante la aplicación de precursores metabólicos radioactivos y técnicas de autoradiografía, rutinariamente empleadas para estudiar la síntesis y modificaciones postraduccionales de proteínas y/o precursores peptídicos previos a la secreción exocítica de moléculas bioactivas (Weiss y Hiscoe, 1948, Palay y Palade, 1955, Droz y Leblond, 1963; Young y Droz, 1968).

b).- Condensación y segregación de proteínas en tejidos exocrinos y endocrinos. Un aspecto básico inicial de la regulación de la síntesis y modificación postraduccionales de proteínas en las células de secreción endocrina y exocrina, es la condensación y concentración de macromoléculas en gránulos de secreción osmóticamente inertes, eventos celulares que diferencian la secreción regulatoria de la secreción constitutiva (Tooze y col., 1989). Diversos estudios experimentales, han demostrado, que el material proteico sintetizado en células de secreción endocrina, destinado a ser secretado por la ruta de secreción regulatoria, es concentrado ≈ 200 veces en compartimentos vesiculares (v.g., zimogénos, gránulos intracisternales, ICGs) en el retículo endoplásmico rugoso, (rER) y en el sistema cisternal del aparato de Golgi (particularmente en la porción distal del Golgi o Trans-Golgi) (Facqhar y Palade, 1981; Burgess y Kelly, 1987). Asimismo, el material proteico sintetizado es diferencialmente concentrado ≈ 10 veces por el mismo sistema vesicular en células exocrinas, aunque experimentalmente se ha podido inducir la condensación prematura de proteínas en las cisternas del rER y en las cisternas de la región proximal (v.g., Cis-Golgi) y medial del Golgi (Broadwell y Oliver, 1981, Tooze y col., 1989), mediante la hiperestimulación de tejidos neuroendocrinos (v.g., melanotropos de la pars intermedia de la hipófisis, las células neurosecretorias de la neurohipofisis, las células α y β del páncreas, etc.), efecto que conlleva a incrementar sustancialmente la síntesis, acumulación y concentración prematura de hormonas peptídicas como la α - MSH, glucagón, insulina, vasopresina y oxitocina en vesículas intracisternales en los organelos mencionados (Facqhar, 1971, Tooze, 1989).

c).- Modificación postraduccionales de proteínas de secreción. Durante la segregación y transporte vesicular del material proteico recién sintetizado desde el rER a la porción proximal del Golgi, a través de "elementos de transición" (Rothman y col., 1981), diversas modificaciones postraduccionales constitutivas, particularmente la glucosilación proximal de las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas y la formación de puentes disulfuro, dando origen a conformaciones terciarias de las macromoléculas (Rothman, 1981). Este material, transportado y concentrado en forma dependiente de un gradiente de pH y energía (ATP) en vacuolas de condensación desde el Trans-Golgi a gránulos de secreción, es posteriormente modificado por enzimas de glucosilación, acetilación y fosforilación y diversas actividades enzimáticas

proteolíticas (endopeptidasas y exopeptidasas), que originan la multifuncionalidad de diversas moléculas secretorias con actividades enzimáticas (enzimas digestivas, amilasa, DBH, AChE), actividades tróficas (neurotrofinas, GDNF, PDNF, BDNF, IGF I y II, etc.)(ver sección de abreviaturas, en el inicio del manuscrito), péptidos bioactivos (v.g., insulina, glucágon somatostatina, encefalinas, etc.) y precursores peptídicos (v.g., cromograninas) (Rothman , 1981; Livett, 1984; Wacshek y col., 1989; Sundler y col , 1989; Takuma y col., 1994).

d).- Síntesis y transporte axonal de proteínas en el SNC.- Mediante el empleo de isótopos radiactivos acoplados a precursores metabólicos de la síntesis de proteínas celulares aunados al empleo de las técnicas de autoradiografía, diversos autores han demostrado el transporte vectorial de trazadores radioactivos, desde las regiones subcelulares donde se origina la síntesis proteica hacia el citoesqueleto axonal, donde el material incorporado a vesículas endocíticas es transportado por los axones a la terminal sináptica de las células nerviosas. Bajo este contexto, se ha podido demostrar que posterior a la inyección ventriculo-cisternal, de un precursor radioactivo (v.g., Leu- H^3), el trazador radioactivo aparece muy tempranamente (5 min.) en el rER de las células neuronales, observándose que éste es translocado 20-30 min. posteriores al sistema cisternal del aparato de Golgi, donde subsecuentemente la radioactividad es localizada y concentrada preferencialmente, en las porciones proximal y medial de los axones neuronales, en un gradiente somatofugal 30-90 min. posteriores (Edstrom, 1966; Koenig, 1967, Young y Droz, 1968).

De esta manera, diversos estudios experimentales enfocados a estudiar el transporte axonal de diversas moléculas proteicas en diferentes preparaciones biológicas del tejido nervioso de mamíferos e invertebrados marinos) mostrarón la existencia de dos tipos de transportes neuronales: *un transporte axonal anterogrado* (somatofugal) y *un transporte dendrítico somatofugal* (Droz y Leblod, 1962, 1963. Globus y col, 1968; Kreuzber y Toth, 1974). Estos estudios, dieron conocimiento que el transporte axonal rapido permite el transporte de material proteico vesiculado a una velocidad relativa de 200- 400 mm/día (Mcewen y Grafstein, 1968; Stone y col, 1984), en tanto que el transporte axonal lento, que facilita el transporte de proteínas estructurales del axón (microfilamentos, neurofilamentos y componentes proteicos del axolemma) ocurre a velocidades de flujo relativas de 1-5mm/día o a velocidades intermedias de 4-40 mm/día (Lasek , 1970; Williard, 1974; Heslop, 1975; Blank y Lasek, 1977). Asimismo, diversos trabajos, han demostrado que el transporte axonal de vesículas endocíticas no ocurre en forma homogénea y regular sino en pulsos "saltatorios" anterogrados y retrogrados simultáneamente (Forman y col., 1977), demostrándose que todo material proteico segredo a vesículas secretorias pasa obligatoriamente por el aparato de Golgi donde el material intravesicular es modificado posttraduccionalmente (Hammeschlag y col., 1982).

En general puede resumirse que dependiendo del tipo de material biológico transportado, las neuronas son capaces de manejar diferentes flujos de transporte axonal (Brimijoin, 1975; Koenig, 1985). Bajo este concepto, se ha podido demostrar

que una fracción importante de material proteico sintetizado de novo y transportado vesicularmente por flujo axonal rápido, incluye glucoproteínas y proteínas no glucosiladas que contienen un alto grado de grupos sulfato (SO_4) acoplados a residuos de tirosina (Stone y col., 1984 a y b) como lo confirma el análisis electroforético bidimensional de estas sulfoproteínas, revelados por métodos autoradiográficos (Stone y col., 1983). Asimismo, el transporte dendrítico de macromoléculas (observado inicialmente en motoneuronas espinales) ocurre a velocidades inferiores al estimado en las prolongaciones axonales; esto es, a velocidades relativas de 1-5 $\mu\text{m}/\text{seg.}$, siendo este transporte, similarmente bloqueado por antagonistas farmacológicos que inhiben la polimerización de los microtubulos del axón (v.g., tubulina), como es la colchicina (Schbert y col., 1972; Kiss y col., 1977).

Bajo este contexto, se ha podido demostrar también, que las neuronas son capaces de transportar vesículas endocíticas (vesículas sinápticas y gránulos de secreción) a través de un transporte axonal retrogrado con velocidades relativas similares al flujo axonal anterogrado rápido. Este transporte tiene importancia en la regulación del reciclaje de proteínas estructurales de membrana, así como en la degradación y reconstitución de proteínas estructurales de la neurona (Kristenson y col., 1971).

e).- Transferencia de proteínas de origen glial al axón.- Diversas recopilaciones experimentales, enfocados a estudiar la interacción química entre células gliales y neuronas, particularmente en el tejido cerebral de invertebrados marinos, han demostrado la participación de las células gliales en la transferencia de material proteico a las neuronas, en especial, al axolemma neuronal. Estas observaciones se basan primeramente, en la aparición de material proteico de origen glial en el axoplasma y axolemma del axón gigante del calamar (dm 0.5 mm) posterior a la incubación de los axones escindidos de sus cuerpos neuronales con diferentes precursores metabólicos de la síntesis proteica; segundo, el axoplasma aislado de células gliales periaxiales, no incorporan aminoácidos radioactivos a proteínas estructurales de membrana; y tercero; la inyección intra-axonal de RNAsas, no reduce la deposición de proteínas recién sintetizadas en la membrana axonal (Lasek y col., 1971; Tytell y Lasek, 1981).

Mas aun, estos autores muestran la translocación de una fracción heterogénea (\approx 40%) de proteínas de origen glial (12-200 kDa) a la membrana y citoplasma axonal por un mecanismo dependiente del Ca^{++} extracelular (Lasek., 1977; Tytell y Lasek, 1981), siendo en su mayoría polipéptidos diferentes a los comúnmente sintetizados en el soma neuronal (Tytell y Lasek, 1984). Estas proteínas pudiesen funcionar como factores tróficos, relevantes para la viabilidad funcional del axón y/o de soporte para la regeneración del mismo (Goldstein, 1982).

Mediante el empleo de la microscopía electrónica, diversos autores se han percatado de la presencia de "canales citoplásmicos", representados por áreas de "continuidad" entre el citoplasma axonal y el citoplasma glial, estructuras microanatómicas, que

podiesen explicar el flujo bidireccional de material proteico de origen neuronal como glial (Perrachia, 1981; Goldstein, 1982).

f).- Aspectos relevantes en la interacción neurona-glia.- Estudios pertinentes a la regulación de la secreción neuroendocrina de diversas hormonas peptídicas han puesto en evidencia, que dicha secreción esta regulada en forma importante por la actividad de factores de secreción glial, cuya secreción es controlada, asimismo, por diversos esteroides y hormonas de naturaleza peptídica. Bajo este contexto, se ha podido establecer que la secreción neuronal de LHRH en la eminencia media del hipotálamo, esta regulada por factores tróficos secretados por astrocitos y tanicitos (células gliales modificadas que cubren la pared del tercer y cuarto ventrículo), tales como TGF- α , IGF-I, a través de su unión con autoreceptores específicos (tipo EPGF) expresados en la superficie glial, permitiendo la autoexpresión y autoinducción de la secreción del mismo factor así como de otras sustancias neuroactivas (v.g., prostaglandinas E₂) que favorecen la secreción de neuropéptidos y glucoproteínas.

Asimismo, el análisis ultraestructural del sistema hipotálamo-neurohipofisial (SHN), muestra que en diferentes condiciones fisiológicas (v.g., lactancia, deshidratación hiperosmolar, etc.), los astrocitos como los pituicitos son capaces de aislar los cuerpos neuronales y dendritas entre diferentes grupos neuronales que estructuran el NPV y NSO (ver sección de abreviaturas) que al "retraerse" favorecen un incremento en el contacto interneuronal así como con el tejido neuro-hemal (Theodosis y MacVicar, 1996).

g).- Transporte transneuronal de proteínas secretorias.- El sistema visual de invertebrados ha sido la preparación biológica mas utilizada, para estudiar la transferencia transneuronal de macromoléculas. Utilizando diversos precursores metabólicos radioactivos, como ³H-Pro, ³H-Leu, ³H- Asp, ³H-Pro ³⁵S-Met, diversos autores pudieron confirmar mediante ensayos de autoradiografía, la migración de moléculas proteicas sintetizadas en las células ganglionares de la retina al tectum óptico contralateral, efecto que no es bloqueado por inhibidores de la síntesis proteica (v.g., cicloheximida) (Elam y Agranoff, 1971; Peale y col., 1977). Estos autores confirman que la translocación de trazadores radioactivos ocurre independientemente a la síntesis *de novo* de proteínas (Elam y Agranoff, 1971; Peale y col., 1977). Asimismo, en vertebrados superiores (Macacrus rhesus) se comprobó que el material proteico sintetizado en la retina (células ganglionares) 3 y 30 días posteriores a la inyección intraocular de ³H-Leu, el 50-70 % de la radioactividad se localizaba en los mismos axones ganglionares de la retina, en tanto que un 20-30 % de la radioactividad se confinaba en las terminales presinápticas, datos que confirmaban que la transferencia de material proteico sintetizado en la retina era transportado por un flujo axonal anterogrado rápido a la terminal presinaptica, en tanto que la mayoría de la radioactividad localizada en el axoplasma era transportada por un flujo axonal lento (Hendrickson, 1972).

Bajo este lineamiento, Grafstein, muestra que solo una pequeña fracción de material proteico (2%) marcada con ^3H -Pro o ^3H -Fucosa y precipitada con TCA, localizada inicialmente en el tracto óptico y núcleo geniculado lateral (NGL) del primate, es translocada transinápticamente a la corteza visual contralateral 5-8 hrs. posteriores a la inyección IOC del trazador radioactivo (Grafstein, 1971), localizándose el precursor radioactivo incorporado a material proteico, particularmente en la lámina IV de la corteza, área donde se incrementaba la señal autoradiográfica (Grafstein y Laureno, 1973); identificando que una proporción importante del material translocado, está integrado por glucoproteínas (Speck y Grafstein, 1973).

En extensión a los estudios elaborados por estos autores, las técnicas autoradiográficas permiten revelar que el material proteico sintetizado *de novo*, en la retina se deposita en columnas de dominancia ocular en la corteza occipital contralateral y estratos similares del núcleo geniculado lateral (NGL) ipsilateral, misma que recibe aferentes axonales de las células ganglionares de la retina relacionada con la inyección IOC del precursor metabólico (Weisel y col., 1974, Drager y col., 1974).

HIPOTESIS GENERAL

La estimulación química del tejido nervioso induce la liberación de diferentes mensajeros químicos que afectan la transmisión sináptica, entre las que se encuentran los péptidos bioactivos, aminoácidos y aminas biogénicas. Asimismo, la estimulación química despolarizante del tejido nervioso, induce la liberación de sustancias proteicas de alta masa molecular que al igual que los demás neurotransmisores son secretadas de las terminales presinápticas al espacio interneuronal y por el posible papel funcional que podrían desempeñar en la regulación o modulación de la transmisión sináptica, éstas moléculas mensajeras representan una fuente de estudio importante e interesante en el campo de la neurobiología y en particular en la química del sistema nervioso central de los mamíferos.

HIPOTESIS EXPERIMENTAL

- 1).- El material proteico liberado bajo estimulación química del tejido nervioso, debería estar presente en el espacio extracelular, en una concentración dada que permitiría su detección por ensayos químicos utilizados para cuantificar proteínas en líquidos biológicos, como es el método colorimétrico de Lowry.
- 2).- Este material proteico deberá ser fácilmente colectado en fracciones de perfusado, durante la estimulación química del tejido nervioso con soluciones despolarizantes o bajo condiciones basales de perfusión (esto es, no estimulación del tejido)
- 3).- El material proteico liberado bajo condiciones de estimulación despolarizante del tejido nervioso durante la perfusión *in vivo* del animal (rata) deberá estar enriquecido significativamente en las fracciones colectadas durante la estimulación del tejido.
- 4).- Este material liberado bajo las condiciones de estimulación con soluciones de perfusión despolarizantes, conteniendo 50 mM del ión K^+ y 1.8 mM de Ca^{++} . (Bayón, y col., 1985, 1986), debería ser bloqueado cuando se aplican agentes farmacológicos específicos que antagonizan canales de calcio.
- 5).- Por tanto, si este material es liberado bajo condiciones de estimulación fisiológica, debería por principio provenir del tejido nervioso, esto es, tener un origen neuronal y/o glial, y por conclusión no deberán provenir del compartimento vascular o compartimentos extraneurales.

HIPOTESIS GENERAL

La estimulación química del tejido nervioso induce la liberación de diferentes mensajeros químicos que afectan la transmisión sináptica, entre las que se encuentran los péptidos bioactivos, aminoácidos y aminas biogénicas. Asimismo, la estimulación química despolarizante del tejido nervioso, induce la liberación de sustancias proteicas de alta masa molecular que al igual que los demás neurotransmisores son secretadas de las terminales presinápticas al espacio interneuronal y por el posible papel funcional que podrían desempeñar en la regulación o modulación de la transmisión sináptica, éstas moléculas mensajeras representan una fuente de estudio importante e interesante en el campo de la neurobiología y en particular en la química del sistema nervioso central de los mamíferos.

HIPOTESIS EXPERIMENTAL

- 1).- El material proteico liberado bajo estimulación química del tejido nervioso, debería estar presente en el espacio extracelular, en una concentración dada que permitiría su detección por ensayos químicos utilizados para cuantificar proteínas en líquidos biológicos, como es el método colorimétrico de Lowry.
- 2).- Este material proteico deberá ser fácilmente colectado en fracciones de perfusado, durante la estimulación química del tejido nervioso con soluciones despolarizantes o bajo condiciones basales de perfusión (esto es, no estimulación del tejido)
- 3).- El material proteico liberado bajo condiciones de estimulación despolarizante del tejido nervioso durante la perfusión *in vivo* del animal (rata) deberá estar enriquecido significativamente en las fracciones colectadas durante la estimulación del tejido.
- 4).- Este material liberado bajo las condiciones de estimulación con soluciones de perfusión despolarizantes, conteniendo 50 mM del ión K^+ y 1.8 mM de Ca^{++} . (Bayón, y col., 1985, 1986), debería ser bloqueado cuando se aplican agentes farmacológicos específicos que antagonizan canales de calcio.
- 5).- Por tanto, si este material es liberado bajo condiciones de estimulación fisiológica, debería por principio provenir del tejido nervioso, esto es, tener un origen neuronal y/o glial, y por conclusión no deberán provenir del compartimento vascular o compartimentos extraneurales.

6).- Bajo la hipótesis anterior, el tejido neural deberá liberar material proteico sintetizado *de novo*, cuando el tejido es sujeto a la estimulación química despolarizante del mismo posterior de la aplicación local de un precursor metabólico radioactivo que sea capaz de incorporarse a a la maquinaria biosintética de proteínas de las células neuronales.

7).- Por consiguiente, la detección de material proteico sintetizado *in situ* y liberado bajo la acción de agentes químicos que despolarizan el tejido nervioso (K^+ 50 mM) durante los ensayos de perfusión en el animal *in vivo*, será prueba contundente que éste material proteico liberado tiene un origen neuronal y por ende excluye us posible origen vascular.

OBJETIVOS EXPERIMENTALES

1).- El primer enfoque experimental estuvo centrado al diseño, desarrollo y validación de un sistema de perfusión en el animal *in vivo*, utilizando la cánula de perfusión "ranurada", diseño modificado de la cánula perfusión de uso común (Gaddum-Myers) y un sistema de extracción abierto a la presión atmosférica.

2).- Cuantificación del material proteico endógeno secretado al espacio extracelular mediante la estimulación química despolarizante del tejido estriatal (núcleo estriado) utilizando técnicas colorimétricas que permiten Idetectar y estimar concentraciones de proteínas en muestras biológicas.

3).- Diseño, desarrollo y validación de un sistema de inyección intracerebral en el animal *in vivo* de un precursor metabólico radioactivo para evaluar y cuantificar la síntesis y secreción neuronal de material proteico sintetizado *de novo* en el estriado de la rata por medio de la perfusión intracerebral *push-pull*.

4).- Cuantificación del material proteico marcado con el trazador radioactivo sintetizado en el estriado de la rata.

5).- Evaluación del papel funcional del ión Ca^{++} y de agentes químicos y farmacológicos neutralizan la acción fisiológica de este ión durante la secreción del material proteico total y material proteico sintetizado *de novo* en el tejido estriatal

6).- Identificación del origen celular del material proteico sintetizado y secretado por la despolarización química de tejido nervioso.

6).- Bajo la hipótesis anterior, el tejido neural deberá liberar material proteico sintetizado *de novo*, cuando el tejido es sujeto a la estimulación química despolarizante del mismo posterior de la aplicación local de un precursor metabólico radioactivo que sea capaz de incorporarse a a la maquinaria biosintética de proteínas de las células neuronales.

7).- Por consiguiente, la detección de material proteico sintetizado *in situ* y liberado bajo la acción de agentes químicos que despolarizan el tejido nervioso (K^+ 50 mM) durante los ensayos de perfusión en el animal *in vivo*, será prueba contundente que éste material proteico liberado tiene un origen neuronal y por ende excluye us posible origen vascular.

OBJETIVOS EXPERIMENTALES

1).- El primer enfoque experimental estuvo centrado al diseño, desarrollo y validación de un sistema de perfusión en el animal *in vivo*, utilizando la cánula de perfusión "ranurada", diseño modificado de la cánula perfusión de uso común (Gaddum-Myers) y un sistema de extracción abierto a la presión atmosférica.

2).- Cuantificación del material proteico endógeno secretado al espacio extracelular mediante la estimulación química despolarizante del tejido estriatal (núcleo estriado) utilizando técnicas colorimétricas que permiten Idetectar y estimar concentraciones de proteínas en muestras biológicas.

3).- Diseño, desarrollo y validación de un sistema de inyección intracerebral en el animal *in vivo* de un precursor metabólico radioactivo para evaluar y cuantificar la síntesis y secreción neuronal de material proteico sintetizado *de novo* en el estriado de la rata por medio de la perfusión intracerebral *push-pull*.

4).- Cuantificación del material proteico marcado con el trazador radioactivo sintetizado en el estriado de la rata.

5).- Evaluación del papel funcional del ión Ca^{++} y de agentes químicos y farmacológicos neutralizan la acción fisiológica de este ión durante la secreción del material proteico total y material proteico sintetizado *de novo* en el tejido estriatal

6).- Identificación del origen celular del material proteico sintetizado y secretado por la despolarización química de tejido nervioso.

Procedimientos Experimentales

La descripción de la metodología en esta tesis se encuentra desglosada en dos publicaciones que se anexan (I y II). A continuación se describe una guía de los procedimientos experimentales que se emplearon para la obtención de los resultados referentes a la síntesis y liberación de proteínas en el sistema nervioso de la rata.

1.- Cánula de perfusión.- Los detalles concernientes al diseño y construcción de la cánula de perfusión utilizada en nuestros experimentos se encuentran referidas en las siguientes publicaciones

I).- Release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins from the striatum of the freely moving rat. Pags 402-403, **figura 1.**

II).- Síntesis y liberación *in vivo* de proteínas en el sistema nervioso central de la rata. Pags.: 36-37, **diagrama 2.**

2.- Procedimientos quirúrgicos.- En nuestros experimentos de perfusión utilizamos el modelo animal experimental de la rata. Las referencias de la cepa empleada, sexo, peso y procedimientos quirúrgicos como el sitio de implantación de las cánulas se encuentran referidas en las mismas publicaciones :

I).- Release of proteínas, enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins from the striatum of the freely moving rat. Pags 403-404.

II).- Síntesis y liberación *in vivo* de proteínas en el sistema nervioso central de la rata. Pag. 37.

3.- Procedimientos de perfusión.- Las condiciones ambientales de las sesiones de perfusión, localización intracerebral de la cánula de perfusión, procedimientos de bombeo de líquido, medios de perfusión usados, condiciones de estimulación despolarizante y manejo de las fracciones colectadas, se refieren por igual en ambas publicaciones:

I).- Release of proteínas, enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins from the striatum of the freely moving rat. Pags. 403-404, **figura 1.**

II).- Síntesis y liberación *in vivo* de proteínas en el sistema nervioso central de la rata. Pag. 37, **diagrama 2 y diagrama 2a.**

4.- Ensayo de muestras biológicas.- Los ensayos bioquímicos utilizados en la determinación de neurotransmisores no peptídicos, como ^3H -GABA, liberado del tejido nervioso bajo estimulación química despolarizante con alto potasio, así como la determinación de material proteico tisular reactivo a Lowry, la cuantificación de la

radioactividad incorporada a proteína tisular precipitada con ácido tricloro-acético (TCA), cuantificación de la liberación de proteína total, precipitada con TCA, y cuantificación de la liberación proteína marcada con el precursor metabólico, L-³⁵S-Metionina, se refieren en las mismas publicaciones :

I).- Release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins from the striatum of the freely moving rat. Pags 404-406, **figura 1**.

II).- Síntesis y liberación in vivo de proteínas en el sistema nervioso central de la rata. Pag. 37, **diagrama 1**.

5.- Estudios de la incorporación del trazador ³⁵S-Metionina a proteína tisular en el estriado de la rata.-

Diferentes condiciones experimentales preliminares al estudio de la liberación *in vivo* de proteínas marcadas con el trazador radioactivo, L-³⁵S-Metionina, fueron llevadas a cabo con el fin de determinar y cuantificar el grado de incorporación del precursor metabólico a proteína tisular en el tejido neuronal. Estas condiciones experimentales incluyeron :1).- Un grupo experimental control de incorporación *in vitro* del trazador radioactivo a proteína neuronal en homogenados y explantes de tejido estriatal de la rata. 2).- Otro grupo experimental control de incorporación *in vivo* del mismo precursor metabólico a proteína neuronal, empleando ratas Wistar previamente anestesiadas y fijadas en un aparato estereotáxico.

a).- Incorporación de trazador radioactivo a homogenados y explantes hervidos del estriado de la rata.-

Para llevar a cabo estos estudios, el tejido estriatal (caudo-putamen) de cuatro ratas (n=4) machos de la cepa Wistar (peso 250-300 gr.) fue extraído de los cerebros de los animales. Dos de estos (n=2) fueron incubados (hervidos) a una temperatura de ebullición de 92 °C/30 min y colocados después en placas de Petrie y expuestos a la aplicación (inyección) de un pulso único de 3 µCi del trazador radioactivo, L-³⁵S-Metionina (A.E. 1180 Ci/mmol) en 10 µl de medio de perfusión (RKB) durante 15 min. Estos explantes de tejido estriatal (n=2) fueron sometidos al proceso de homogeneización como se describe más adelante. Los estriados restantes (n=2) (≈ 40 mg/ fragmento de tejido húmedo) fueron homogeneizados a 800 r.p.m (Homogenizador Ultrarek) en 1 ml de RKB (4°C) e incubados a una temperatura de ebullición de 92 °C/30 min. Estos homogenados fueron expuestos al mismo procedimiento de aplicación del precursor metabólico [3 µCi/10 µl de medio de perfusión (RKB) durante 15 min].. Todos los homogenados resultantes fueron precipitados inicialmente en un volumen de 1.0 ml de una solución fría de 15% TCA/10 mM de L-metionina y congelados para su uso posterior, mismos que fueron subsecuentemente sometidos a 8 ciclos de centrifugación-precipitación-resuspensión-precipitación-centrifugación como se detalla en la publicación (Salud Mental., Vol. 22

(1) : pag. 38, **diagrama 1**), para obtener un producto final de precipitación correspondiente al material proteico tisular extraído de los homogenados del estriado de la rata.

b).- Incorporación in vivo de trazador radioactivo al tejido estriatal de la rata.-

Para llevar a cabo estos estudios, el tejido estriatal (caudo-putamen) de cuatro ratas machos de la cepa Wistar (peso 250-300 gr.) (n=4) previamente anestesiados con una mezcla de fluotano/CO₂/O₂ (ver materiales y métodos en publicación II) y fijados en un aparato estereotáxico, fue expuesto a la aplicación local de 3 μ Ci del trazador por 15 min (como se detalla en el inciso anterior). Las regiones anatómicas correspondientes al caudo-putamen fueron extraídas 30 min y 4 hr posterior a la inyección local del trazador y sujetas al mismo tratamiento de precipitación con TCA y ciclos de centrifugación y precipitación como se ha descrito (ver inciso anterior y publicación referida).

6.- Difusión del trazador radioactivo ³⁵S-Metionina en el cerebro de la rata.-

Previo a la utilización y validación del sistema de inyección del precursor metabólico radioactivo en el estriado de la rata utilizado para determinar el curso temporal de incorporación del trazador a proteína tisular en el animal *in vivo* (como se detalla en la publicación II), se evaluó la capacidad del tejido estriatal (núcleo estriado) por "confinar" un volumen determinado del aminoácido ³⁵S-Metionina, cuando el estriado del animal *in vivo* es expuesto a la inyección de un pulso único del precursor radioactivo. Para llevar a cabo estos estudios, las regiones del caudoputamen (estriados) de diferentes grupos de animales (n=12), fueron expuestas a la inyección de un pulso único del trazador (10 μ Ci/ 3 μ l de RKB) (ver cirugía y aplicación de trazador en las publicaciones referidas). Las regiones anatómicas del cerebro de los animales correspondientes al sitio anatómico de la aplicación local del trazador (cuadrante A)(ver figura 5 en sección de resultados) como de las regiones ipsilaterales y contralaterales de los cerebros de los animales (cuadrantes B-H) fueron respectivamente disecadas y homogeneizadas a los 15 min, 30 min, 1.5 hr y 4.0 hr después de la extracción de los cerebros y de la aplicación del precursor metabólico bajo las mismas condiciones experimentales expuestas en el inciso anterior.

7.- Ensayos de cromatografía en placa fina - Con el fin de determinar si el precursor metabólico L-³⁵S-Metionina no incorporado a material proteico era liberable de las pozas endógenas celulares, durante las sesiones de perfusión y estimulación química despolarizante del tejido estriatal, se realizaron ensayos de cromatografía en placa fina para determinar la presencia de este trazador en: **1).**- fracciones de perfusados obtenidas durante la estimulación mecánica del tejido durante la sesión de perfusión (n=1) colectadas en un volumen inicial de 1 ml y concentradas en una liofilizadora (LABCONCO) a un volumen final de 500 μ l. **2).**- en fracciones de

perfusado colectadas durante la estimulación química despolarizante del tejido estriatal (con 50 mM de K^+)(n=12) en un volumen inicial de \approx 5 ml y concentradas en una liofilizadora (LABCONCO) a un volumen final de 500 μ l 3).- en fracciones de 1.0 ml. de sobrenadante de homogenado de estriado, sobre el cual se aplico 3 μ Ci del trazador radioactivo (n=1). Alicuotas de 20 μ l de cada una de las fracciones mencionadas, fueron individualmente aplicadas en una placa de celulosa no fluorescente (Merck), cromatografiadas en una fase móvil con los solventes siguientes: *Butanol: ácido acético: H₂O* (120: 30: 50) y reveladas posterior al corrimiento cromatográfico con ninhidrina.

RESULTADOS

1).- Síntesis y liberación de proteínas en el SNC de mamíferos (rata).

Los hallazgos experimentales referentes a la síntesis y liberación de proteínas en el núcleo estriado de la rata, se describen en los artículos publicados en las revistas científicas insertadas al manuscrito de esta tesis.

I).- Bayón, A., Antón, B., Leff, P., and Solano, S. (1986). Release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins, from the striatum of the freely moving rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 473 : 401-417.

Este capítulo fué enviado por invitación de la Academia de Ciencias de Nueva York (presentado en un simposio de la misma) e incluye resultados sobre la liberación basal y estimulada de proteínas en los ganglios basales del roedor (estriado y globus pallidus). En particular, este artículo hace mención sobre la dependencia parcial de liberación de material proteico de origen estriatal cuando se aplica al tejido mismo, agentes farmacológicos que tiene capacidad de quelar cationes divalentes (Ca^{++}) como es el EGTA (ver **figura 4** en este mismo artículo)

II).- Phillippe Leff y Benito Antón. (1999). Síntesis y liberación *in vivo* de proteínas en el sistema nervioso central de la rata. *Salud Mental*. Vol. 22 (1) : 35-45.

En éste artículo, se detalla los hallazgos experimentales pertinentes al curso temporal de incorporación del precursor metabólico L-³⁵S-Metionina a proteína neuronal después de la aplicación *in vivo* del mismo al núcleo estriado de la rata y su precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (**figura 1**). Asimismo, éste artículo detalla los estudios enfocados a estudiar y cuantificar la liberación *in vivo* del material proteico sintetizado *de novo*. Se puede apreciar en la **figura 2 y 3** la dependencia parcial que muestra la liberación de proteína cuando el Ca^{++} extracelular, es quelado por el agente farmacológico, EGTA. En contraposición a estos resultados obtenidos, se puede observar en la **figura 4** el efecto dramático que ejerce el agente farmacológico, verapamil (antagonista de canales de calcio), en inhibir significativamente (98%) la liberación inducida de proteína total (tercera sesión de estimulación). En adición, este artículo muestra la fracción de material proteico sintetizado por las neuronas que ha sido liberado por estimulación química del tejido estriatal y subsecuentemente precipitado con TCA, en relación con la fracción total de proteína tisular marcada con el mismo trazador (ver **cuadro # 1**).

2.- Estudios de la incorporación del trazador ³⁵S-Metionina a proteína tisular en el estriado de la rata.-

a).- Estudios in vitro.- Para determinar el grado de incorporación del precursor radioactivo en precipitados de proteína neuronal de los homogenados y explantes del tejido estriatal previamente hervidos (incubados a 92°C/ 30 min) se modificó la metodología original utilizada por Mans y Novelli para cuantificar la incorporación de aminoácidos radioactivos a proteína en papel filtro (Mans y Novelli, 1960). Esta modificación consistió en colectar tanto los homogeneizados del tejido estriatal como las fracciones de perfusado en tubos Eppendorff y someter las diferentes muestras biológicas precipitadas previamente con ácido tricloacético (TCA) a 8-9 ciclos de centrifugación y resuspensión de las pastillas (pellets) precipitadas [Salud Mental. 22(1); 35-45]. Utilizando esta variación de la metodología original descrita por Mans y Novelli, los resultados experimentales referentes a la incorporación del trazador en homogenados y explantes de tejido hervidos, no mostrarón un incremento importante en la incorporación del aminoácido radioactivo a proteína tisular una vez que se obtuvo el precipitado final de los homogenados (fracción NaCl), observándose en éstas fracciones una pobre recuperación del trazador (cpm totales) incorporado a material reactivo a Lowry (ver figuras de resultados 1 y 2), (0.2% en homogenados hervidos; 0.1% en caudados hervidos).

Mas aun, indistintamente de la preservación del contenido de proteína total (18% - 20%) a lo largo de los ciclos de precipitación y centrifugación en las diferentes fracciones obtenidas (**S1, P2, NaCl**) la baja recuperación de trazador incorporado a proteína puede asumirse como resultado de la desnaturalización de las actividades enzimáticas celulares responsables de la biosíntesis proteica posterior a la incubación de las muestras a temperaturas de ebullición de 92 °C.

b).- Estudios in vivo.- En extensión a los datos experimentales expuestos previamente, los resultados obtenidos después de la aplicación del precursor radioactivo en el animal *in vivo*, y de la extracción y homogeneización del tejido estriatal a diferentes tiempos (30 min y 4 hrs), indican que a lo largo de un curso temporal de 4 horas existe un incremento proporcional en la incorporación del trazador a proteína tisular, observándose un incremento de 0.7%-1.8% en las fracciones precipitadas con TCA y resuspendidas finalmente en una solución de 0.15M NaCl/ 0.1N NaOH (ver metodología en publicación II); 30 min y 4 hrs posteriores a la aplicación local del precursor radioactivo (figura 3 y 4). Estos resultados muestran que en el tejido intacto existe una incorporación significativa del aminoácido radioactivo a proteína tisular, evento que puede ser observable a lo largo de un curso temporal de síntesis de proteína más extenso., como se muestra en la estimación de las actividades específicas de la incorporación del trazador a material reactivo a Lowry en un curso temporal de 12 hrs.(Publicación anexa, Salud Mental, figura 1, pag.: 40).

3.- Difusión del trazador radioactivo (³⁵S-Metionina) en el cerebro de la rata.-

Con el fin de evaluar la posible difusión del trazador a lo largo del parénquima cerebral, la región del caudo-putámen de diferentes animales previamente anestesiados y fijados a un aparato estereotáxico, fue expuesta a la inyección del trazador radioactivo ($70 \times 10^6 \pm 11.5 \times 10^6$ cpm/3 μ l. de RKB). Como se puede apreciar en las gráficas representativas del curso temporal de incorporación del trazador al tejido neuronal, prácticamente el trazador se confinó al sitio anatómico de inyección (figura 5, cuadrante A, gráfica inferior), después de estimar la actividad del trazador en los homogenados de las diferentes áreas neuroanatómicas disecadas (Figura 5, cuadrantes A-H) del cerebro de los animales. El hecho de que solamente una pequeña fracción del trazador inyectado al tejido neuronal (≈ 5.0 %) haya sido localizado en regiones adyacentes al sitio de aplicación (cuadrante C), sugiere que el trazador no difunde extensamente a lo largo del parénquima a través de líquidos biológicos (v.g., LCR) [como se puede observar en las regiones anatómicas contralaterales al sitio de inyección del trazador (cuadrantes B y D)].

En resumen, nuestras observaciones experimentales aportan que el trazador es capaz de ser "retenido" localmente por el tejido neuronal en el sitio de aplicación del mismo, independientemente del porcentaje de trazador eliminado o aclarado por extravasación del tejido nervioso ($\approx 40\%$) y asimismo, el remanente (≈ 60 %) ser capturado por las células neuronales locales *in vivo*, transportado e incorporado a la maquinaria biosintética subcelular para lograr así la síntesis *de novo* de material proteico que puede ser analizado en estudios de incorporación *in vivo* del precursor a lo largo de cursos temporales cortos (4 hr) o extensos (12 hr) como se demuestra en la publicación anexada.

Estos resultados permitieron subsecuentemente, determinar el tiempo necesario que requieren las células neuronales para sintetizar y detectar el pico máximo de incorporación del trazador a material proteico sintetizado *de novo*. Con el objeto de estimar el curso temporal de máxima síntesis proteica, diferentes grupos de ratas (n=12) fueron expuestas a la inyección local del precursor radioactivo a lo largo de un curso temporal de 12 hr como se detalla en la publicación anexa (Salud Mental). Los resultados experimentales, mostraron una estabilidad en la incorporación del trazador a proteína endógena 4-12 horas posteriores a la inyección local del precursor metabólico, observándose un pico máximo de síntesis proteica a las 8 hr posterior a la aplicación local del trazador. Estos datos experimentales permitieron establecer con precisión el tiempo óptimo de inicio (4 hrs posterior a la inyección del trazador) y duración de las sesiones de perfusión (8 hr máximas) a lo largo del curso temporal en que se denota la estabilización del proceso de la síntesis del material proteico en el tejido estriatal (4-12 hr) (ver figura 1, publicación Salud Mental).

4.- Ensayos de cromatografía en placa fina En extensión a los resultados obtenidos sobre la liberación *in vivo* del material proteico sintetizado *de novo* en el estriado de la rata, se analizó adicionalmente, por cromatografía en placa fina, la posible liberación del precursor metabólico, ³⁵S-Metionina en las fracciones de perfusado colectadas durante la estimulación química despolarizante del tejido neuronal y/o la estimulación mecánica del mismo, como se detalló en la sección de procedimientos experimentales.

El corrimiento cromatográfico de diferentes muestras biológicas (lesión, sobrenadante de estriado y material liberado y colectado en perfusados) que contienen el trazador radioactivo, muestra que una proporción elevada del trazador (80%) capturado localmente por las neuronas estriatales, es liberado bajo estimulación mecánica del tejido, como se observa en el corrimiento respectivo de la muestra (**figura 6**, gráfica superior, pico inicial, Rf: 0.20). Asimismo, se puede observar la presencia del precursor cuando éste es aplicado exógenamente a una muestra control de sobrenadante de estriado de la rata (**figura 6**, gráfica intermedia, pico inicial, Rf: 0.24), en tanto que, las fracciones de perfusado colectadas posterior a la estimulación química del tejido, no muestran una fracción liberable significativa del trazador capturado por el tejido neuronal (**figura 6**, gráfica inferior, pico inicial, Rf: 0.08).

Estos resultados sugieren y apoyan que las fracciones de perfusado colectadas durante las sesiones de perfusión así como de los homogenados de tejido estriatal expuestas a la precipitación inicial con una solución de 15 %TCA/10 mM de L-metionina y sujetas subsecuentemente a los ciclos de centrifugación y tratamiento del material proteico precipitados con diferentes soluciones orgánicas (etanol, éter-etanol) (ver procedimientos experimentales en la publicación anexa, Salud Mental) permite excluir la fracción de trazador libre no incorporado a proteína tisular y estimar en forma exclusiva el trazador radioactivo incorporado a proteína liberable ó proteína endógena tisular posterior a la precipitación y tratamiento de los perfusados y homogenados de tejido estriatal con ácidos y soluciones orgánicas.

**FIGURAS DE RESULTADOS NO
INCORPORADOS A LAS
PUBLICACIONES REFERENTES Y
ANEXADAS AL CUERPO DE LA
TESIS.**

FIGURAS DE RESULTADOS

FIGURA 1.- Determinación de ^{35}S -Metionina en homogenados hervidos.

El estriado de dos ratas (n=2) fue extraído y homogeneizado en 1.0 ml de RKB aplicándose 3 μCi del trazador para determinar su incorporación a proteína tisular siguiendo el protocolo descrito en artículos anexos referente a los ciclos de precipitación (con 15 % TCA/10 mM L-metionina) centrifugación, resuspensión, reprecipitación y centrifugación de las diferentes fracciones obtenidas. La primera serie de gráficas (izquierda) representa la determinación de cuentas totales (cpm) del trazador presente las fracciones precipitadas con TCA y centrifugadas a lo largo del ensayo. La segunda serie de gráficas representa la estimación de proteína analizada por el método cuantitativo de Lowry en las fracciones señaladas.

^{35}S -Met, cpm totales de trazador aplicado.

LEI, cpm recuperadas del trazador aplicado posterior al lavado externo e interno del sistema de inyección (jeringa Hamilton-cánula de inyección).

HOM, cpm recuperadas del trazador en **homogenados** de estriado (graficas de lado izquierdo) y de proteína total (graficas de lado derecho)

S1, cpm recuperadas del trazador en **sobrenadantes** de estriado (graficas de lado izquierdo) y de proteína total (graficas de lado derecho)

P1, cpm recuperadas del trazador en los **primeros precipitados de homogenados** de estriado (graficas de lado izquierdo) y de proteína total (graficas de lado derecho)

P2, cpm recuperadas del trazador en los **precipitados de sobrenadantes** de estriado (graficas de lado izquierdo) y de proteína total (graficas de lado derecho)

S2-S8= cpm recuperadas del trazador en los **sobrenadantes** de estriado (graficas de lado izquierdo) obtenidos durante los ciclos de precipitación-centrifugación-resuspensión y tratamiento con soluciones orgánicas de las respectivas pastillas (pellets).

NACL., cpm recuperadas del trazador en las **últimas fracciones precipitadas (P8)**, obtenidas a partir de los precipitados de los sobrenadantes de tejido estriatal (S1,S2) resuspendidas en 0.15 M de NaCl / 0.1 N de NaOH.(graficas de lado izquierdo) y de proteína total (graficas de lado derecho los ciclos de precipitación-centrifugación)

LAVADOS= ciclos de precipitación-centrifugación-resuspensión-reprecipitación de los pastillas resuspendidas con las diferentes soluciones orgánicas

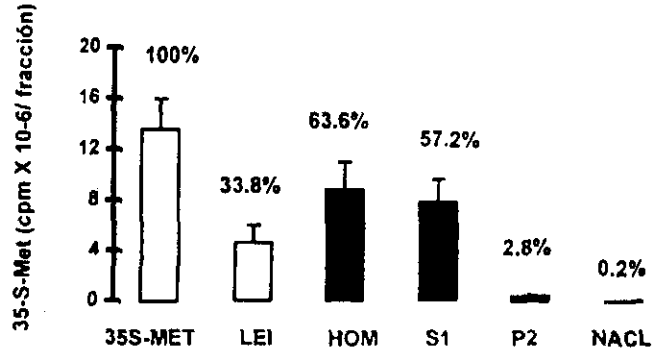
% , recuperación porcentual de proteína total estimada por el método de Lowry así como de cpm del precursor metabólico aplicado en cada fracciones obtenidas

FIGURA 2.- Determinación de ³⁵S-Metionina en extractos de estriado hervidos. El estriado de dos ratas (n=2) fue extraído e incubados a 92°C/ 30 min., aplicándose posteriormente 3 µCi del trazador y determinándose su incorporación a proteína tisular siguiendo el protocolo descrito en artículos anexos referente a los ciclos de precipitación (de homogenados y sobrenadantes con 15 % TCA/ 10 mM L-metionina)-centrifugación-resuspensión-reprecipitación y centrifugación de las diferentes fracciones obtenidas. La primera serie de gráficas (izquierda) representa la determinación de cuentas totales (cpm) en cada fracción precipitada y/o resuspendida a lo largo del ensayo. La segunda serie de gráficas representa la estimación de proteína analizada por el método cuantitativo de Lowry en las fracciones señaladas.

FIGURA 3 y 4.- Determinación in vivo de ³⁵S-Metionina en el estriado de la rata. El estriado de las ratas (n=4) fue extraído posterior a la aplicación local de 3 µCi del trazador a los animales anestesiados, fijados previamente en un aparato estereotáxico. La determinación de la incorporación del trazador a proteína tisular se realizo 30 min. (**figura 3**) y 4 hrs. (**figura 4**) posterior a la inyección local del trazador y extracción de las regiones anatómicas correspondientes, siguiendo el protocolo descrito en artículos anexos referente a los ciclos de precipitación -centrifugación-resuspensión-reprecipitación y centrifugación de las diferentes fracciones obtenidas . La primera serie de gráficas (izquierda) representa la determinación de cuentas totales(cpm) en cada fracción precipitada y/o resuspendida a lo largo del ensayo. La segunda serie de gráficas representa la estimación de proteína analizada por el método cuantitativo de Lowry en las fracciones señaladas.

Figura 1

Incorporación de ^{35}S -Metionina en extractos totales hervidos del estriado de la rata (n=2)



Determinación de proteína total (n=2)

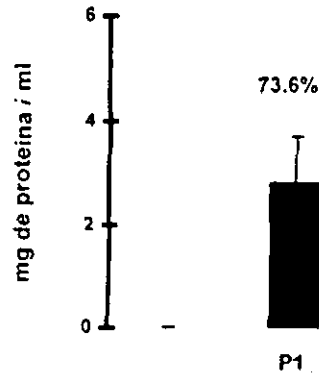
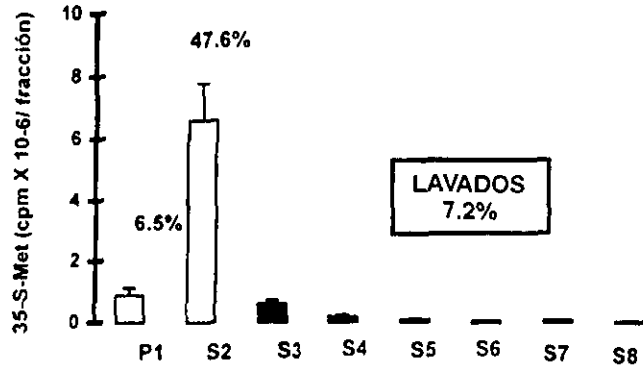
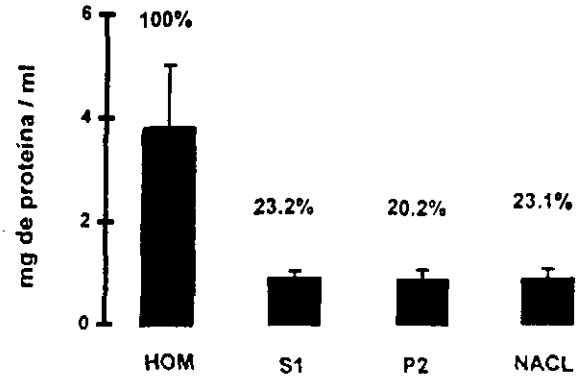
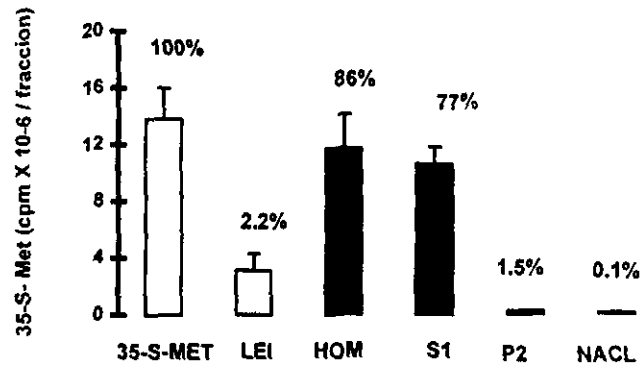
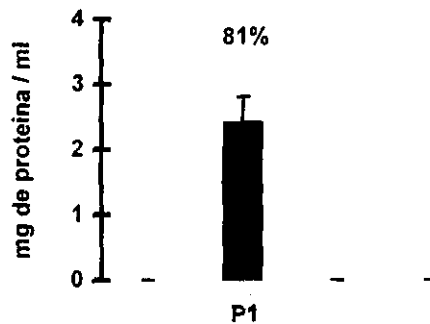
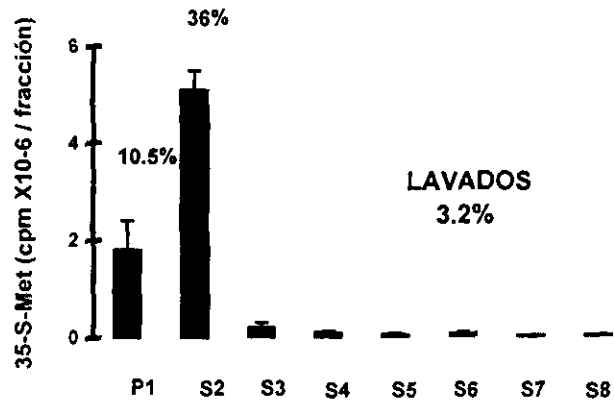
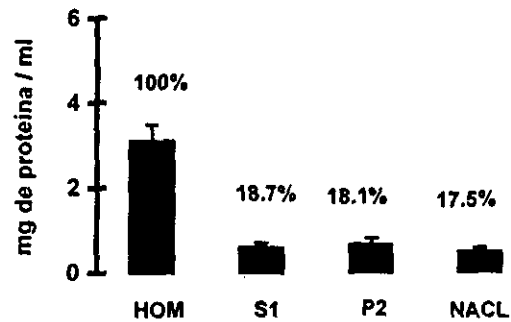


Figura 2

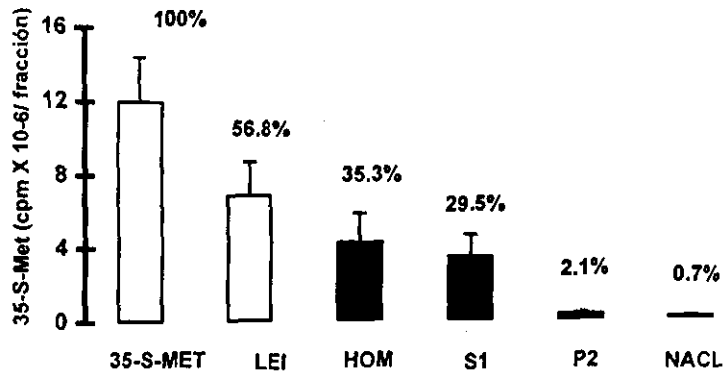
Incorporación de 35-S-Metionina a homogenados hervidos (n=2)



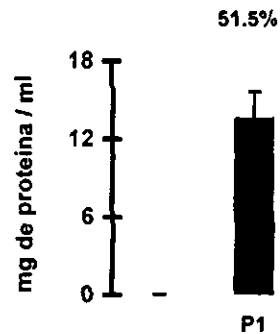
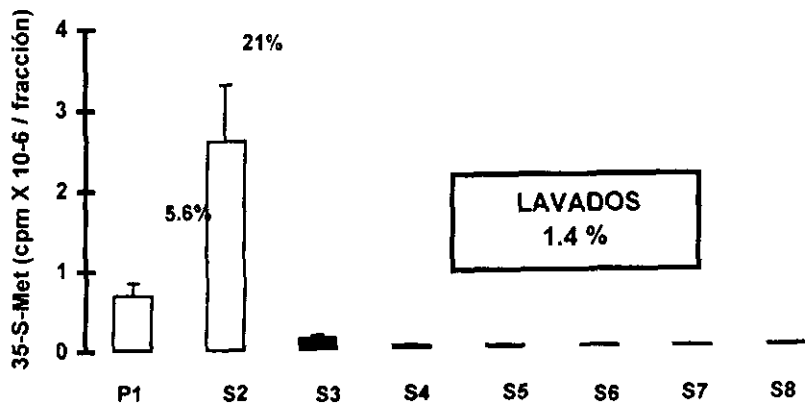
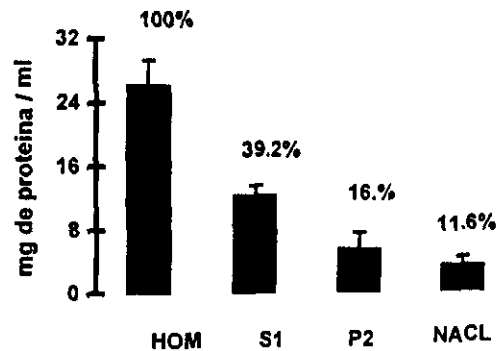
Determinación de proteína en homogenados hervidos (n=2)



Incorporación *In Vivo* de 35-S-Metionina a proteína tisular en el estriado de la rata (n=2)

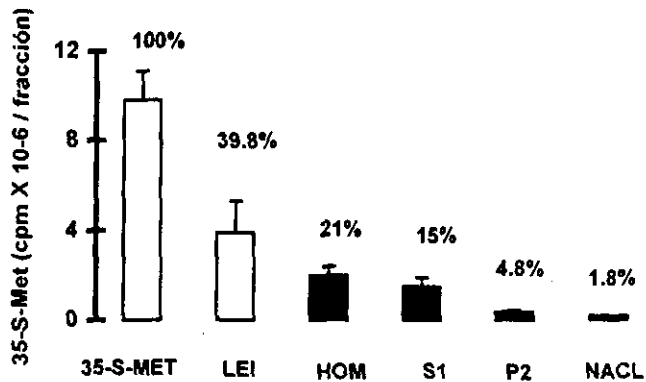


Determinación de proteína en el estriado de la rata (n=2)

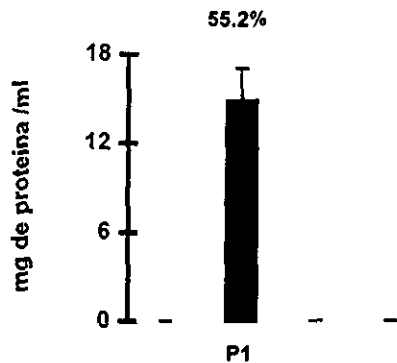
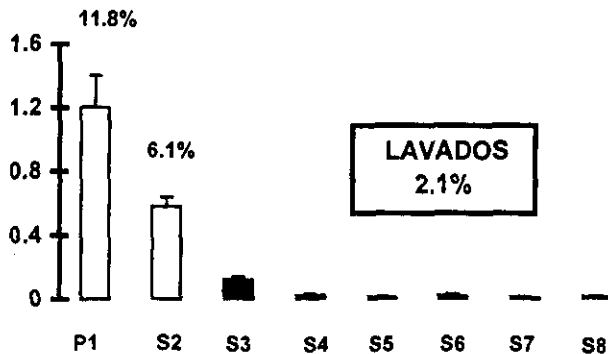
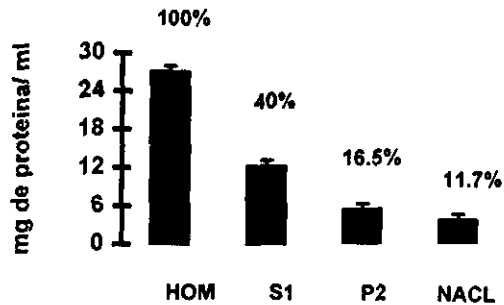


30 min.

Incorporación *In Vivo* de 35-S-Metionina a proteína tisular en el estriado de la rata (n=2)



Determinación de proteína en el estriado de la rata (n=2)



4 horas

FIGURA 5.- Determinación de ^{35}S -Metionina en diferentes regiones anatómicas del cerebro de la rata. 12 ratas anestesiadas y fijadas previamente en un aparato estereotáxico, fueron sometidas a la aplicación de un pulso único del trazador radioactivo ($3 \mu\text{Ci}$). A diferentes tiempos (0, 0.5, 1.5, 4.0 hrs.) 8 regiones anatómicas (cuadrantes) fueron extraídos y homogeneizados ($n=3$) como se describe en la sección de procedimientos experimentales, con el fin de determinar la actividad del trazador (cpm) en cada una de las regiones cerebrales esquematizadas para estimar la difusión del precursor radioactivo a lo largo del parénquima cerebral.

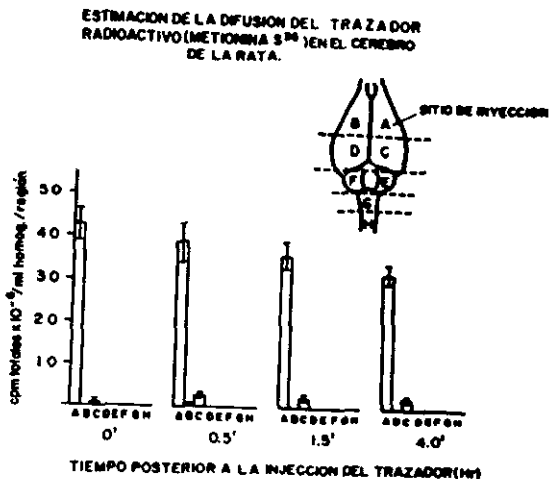
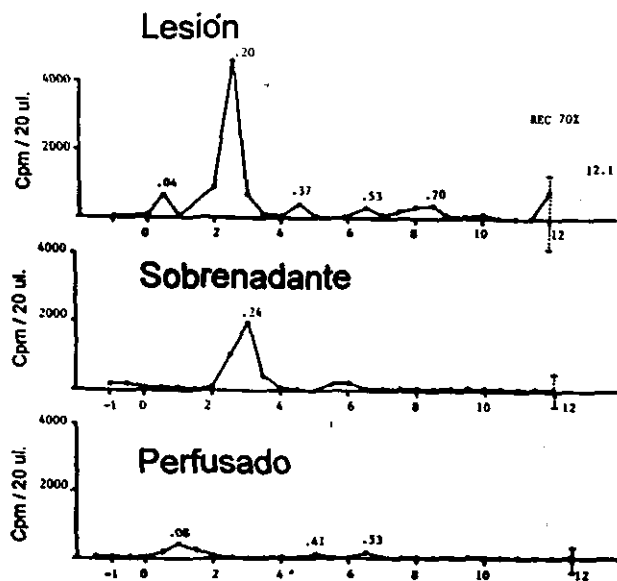


FIGURA 6.- Determinación de la liberación de ^{35}S -Metionina libre en perfusados del tejido cerebral. Diferentes muestras de perfusado colectados de animales expuestos a la aplicación local del trazador radioactivo fueron ensayadas por cromatografía en placa fina (como se detalla en la sección de procedimientos experimentales) aplicándose 20 μl de las muestras representativas por carril. Las muestras cromatografiadas son representativas de: 1).- un perfusado colectado durante la estimulación mecánica del tejido estriatal (**lesión**). 2).- muestras concentradas de perfusados colectados durante la estimulación química despolarizante del tejido (**perfusados**) y 3).- muestra de un **sobrenadante** control de estriado de rata (al cuál se le adició 3 μCi del trazador radioactivo). Las muestras fueron sometidas en forma individual al corrimiento cromatográfico. El gel fue cortado en secciones de 0.5 mm y los fragmentos fueron colocados individualmente en viales de centelleo conteniendo líquido de centelleo (tritosol).

Cromatografía en placa fina (Thin Layer Chromatography)



**RESULTADOS
EXPERIMENTALES
REFERIDOS EN LAS
SIGUIENTES
PUBLICACIONES
ANEXADAS**

Síntesis y liberación *in vivo* de proteínas en el sistema nervioso central de la rata¹

Philippe Leff*
Benito Antón*

Summary

We have reported the depolarization-evoked release of both the inhibitory amino acid GABA, and the peptide neuromodulator enkephalin (Bayón et al. 1986). Additionally, a particular interesting finding observed along the course of these experiments were both an *in vivo* resting and K⁺-evoked release of protein-like material from the striato-pallidal region of the rat brain (Bayón, et al. 1986). With regard to this issue, Bayón et al. (1986) observed that the chemical depolarization of the rat nervous tissue with K⁺ 50 mM in the presence or absence of Ca⁺⁺ (1.8 mM) showed that this evoked release material as detected by Lowry in collected perfusates was at least partially dependent on the presence of external Ca⁺⁺, and their release follows the well known neuronal secretion mechanisms. Although the origin of this material was not completely clear, we explored the hypothesis that at least part of these material might come from neuronal sources after labeling the striatum of the rat with an aminoacid precursor such as ³⁵S-Methionine. Our results show that a small fraction of the incorporated labeled precursor into TCA precipitated nerve tissue protein is evokedly released by chemical depolarization, which suggests that the release of this material into the ECS might have an important role in neural communication, as demonstrated with high molecular species such as AchE and Dopamine Beta-hydroxylase.

Key words: Proteins, synthesis, striatum, nerve tissue, rat.

Resumen

Previamente informamos sobre la liberación inducida por despolarización del aminoácido inhibitorio GABA y del péptido modulator encefalina (Bayón y col. 1986). Un hallazgo interesante observado durante el curso de estos experimentos es el hecho de que sustancias de alto peso molecular cuantificadas por el método de Lowry, son liberadas *in vivo* en condiciones basales y por estimulación despolarizante del tejido nervioso de la rata con K⁺ 50 mM. Dentro de este contexto, Bayón (1986) observó que la liberación inducida del material proteico con K⁺ 50 mM en el estriado de la rata, era parcialmente dependiente de la concentración de Ca⁺⁺ en el líquido de perfusión (1.8 mM), lo que sugería que la secreción neuronal de este material proteico de alto peso molecular, se libera por los mecanismos fisiológicos establecidos de acoplamiento "estímulo-secreción" que se dan para los transmi-

sores peptídicos y para los transmisores no peptídicos. Sin embargo, el origen de este material proteico, liberado bajo estimulación química despolarizante del tejido nervioso, aún queda por elucidarse, puesto que este material pudiera tener un origen plasmático mediante la extravasación de proteínas del compartimento vascular al espacio intraneuronal. Dentro de este contexto exploramos la hipótesis de que este material proteico pudiera tener un origen neuronal exclusivo, mediante la aplicación local de un precursor metabólico, como es el aminoácido ³⁵S-Metionina al estriado de la rata. Nuestros resultados muestran que sólo una pequeña fracción del material proteico sintetizado *in situ* y precipitado por TCA, es liberado en condiciones basales y en condiciones de despolarización química del tejido nervioso durante la perfusión *in vivo* del estriado de la rata. Estos resultados preliminares sugieren, por lo menos, que este material de alto peso molecular liberado al espacio sináptico pudiera ejercer funciones importantes en la comunicación química intraneuronal, tal como se ha encontrado en otras especies de alto peso molecular, como la AchE y la dopamina-beta-hidroxilasa (DBH).

Palabras claves: Proteínas, síntesis, estriado, tejido nervioso, rata.

Introducción

Un número importante de estudios experimentales ha demostrado la liberación *in vivo* e *in vitro* de diferentes sustancias neuroactivas de bajo y alto peso molecular cuando el tejido nervioso es despolarizado. Se han empleado diversos modelos experimentales para estudiar la secreción de estas sustancias químicas. Uno de estos modelos es el sistema de infusión y extracción de líquido fisiológico artificial, conocido como sistema de perfusión *push-pull*. Con este sistema se ha estudiado y caracterizado la liberación *in vivo*, tanto en condiciones de reposo como inducida por despolarización, de diferentes transmisores nerviosos tales como los aminoácidos GABA, Dopamina y Glutamato, así como de péptidos bioactivos de baja masa molecular, como las encefalinas, CRH, AVP (Bayón y col., 1986; Cheramy y col., 1986; Hery y col., 1986; Hoffman y col., 1997; Tohei y col., 1998).

Además de estos trabajos, nuestro laboratorio y otros grupos de investigación han empleado el sistema de perfusión *push-pull* (Bayón y col., 1981, 1985, 1986; Greenfield, 1980, 1982, 1983a, 1983b, 1984) para demostrar y caracterizar fisiológicamente, la liberación

* Laboratorio de Neurobiología Molecular, División de Investigaciones Clínicas, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, 14370, México D.F.

¹ Dedicado a la memoria del Dr. Alejandro Bayón Caso

inducida por la despolarización química con una alta concentración del ion K^+ (50 mM) de sustancias proteicas de alta masa molecular con actividades enzimáticas como las proteínas acetilcolinesterasa (AChE) y la deshidrogenasa láctica (DHL). Estos hallazgos iniciales mostraron que la liberación de estas enzimas, inducida por la despolarización neuronal, fue dependiente de la presencia del ion Ca^{++} en el medio de perfusión, al igual que la liberación inducida por la despolarización química con alto potasio de transmisores peptídicos y no peptídicos. Estos resultados permiten, por lo menos *a priori*, plantear la existencia hipotética de mecanismos neuronales de liberación de material protéico de alto peso molecular, similares a los que son empleados para la liberación de transmisores clásicos de naturaleza peptídica y no peptídica (v.g., exocitosis). En complemento a esta propuesta hipotética, también sería plausible proponer la existencia potencial de un nuevo grupo de mensajeros químicos, sustancias que serían liberadas por la despolarización neuronal de naturaleza protéica y de alto peso molecular. Este fenómeno de secreción protéica neuronal tendría importantes implicaciones en la comunicación química celular del sistema nervioso, ya que la secreción fisiológica de macromoléculas al espacio interneuronal pudiera representar una forma adicional de regulación de la neurotransmisión sináptica por proteínas neuromoduladoras de bajo recambio metabólico con acciones fisiológicas prolongadas. No obstante estos datos experimentales iniciales, que apoyan la existencia de material protéico cuya secreción sería incrementada hacia el espacio extracelular por la despolarización neuronal, así como las posibles implicaciones funcionales que dicho fenómeno secretorio tendría en el contexto de la fisiología nerviosa, hay datos experimentales controversiales recientes que sugieren que una proporción importante del incremento del material protéico en el espacio extracelular nervioso, que es inducido por la despolarización química con alto potasio, no es de origen neuronal (Jenssen y col., 1978), sino más bien de origen plasmático, debido a un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos por la despolarización química (Delapine y Aubineu, 1997). En este contexto, se ha propuesto que este último mecanismo favorecería la filtración del material protéico del espacio vascular al compartimiento extracelular del tejido nervioso. Por lo tanto, para resolver esta controversia, en el presente trabajo decidimos identificar y asegurar el sitio celular de origen de la secreción inducida por despolarización con alto potasio de material protéico de alto peso molecular. Estos últimos estudios los llevamos a cabo por medio de un abordaje experimental que implica la incorporación *in vivo* del aminoácido Metionina, marcado con el isótopo ^{35}S . Este aminoácido ha sido rutinariamente empleado para identificar y caracterizar molecularmente, en diversas preparaciones biológicas, una amplia gama de moléculas bioactivas de alto y bajo peso molecular (v.g., fracciones isoenzimáticas de pepsinógeno gástrico; la proteínaasa inhibidora de la α_2 macroglobulina del epitelio corneal; nuevos mensajeros peptídicos en el tejido cerebral de invertebrados marinos; el procesamiento diferencial y la estabilidad

de la proinsulina en células beta del páncreas) (Heim, 1997; Huang, 1996; Twining, 1994; Phares, 1996). Así mismo, este trazador radioactivo fue empleado como precursor metabólico para identificar y cuantificar la secreción inducida por la despolarización química del material protéico sintetizado *de novo* en neuronas de la región estriato-palidal del cerebro de la rata.

Objetivos

1. Diseño, desarrollo y validación de un sistema de inyección intracerebral de un precursor metabólico radiactivo para identificar y cuantificar la síntesis y secreción neuronal de material protéico en el núcleo estriado de la rata por medio del método de perfusión *in vivo* intracerebral *push-pull*.
2. Determinación del curso temporal de incorporación del precursor metabólico radioactivo a material protéico tisular.
3. Cuantificación del material protéico marcado con el trazador radioactivo sintetizado en el tejido nervioso del núcleo estriado de la rata.
4. Cuantificación del material protéico marcado por el precursor radioactivo que es secretado mediante despolarización química neuronal.
5. Evaluación del papel fisiológico del ion Ca^{++} sobre la secreción de material protéico marcado con el precursor metabólico. Identificación del origen celular del material protéico recién sintetizado que es secretado por la despolarización química del tejido nervioso.

Materiales y métodos

Animales de experimentación y cirugía estereotáxica para la inyección intracerebral del aminoácido ^{35}S -Metionina, empleado como precursor metabólico para la síntesis y la liberación de material protéico.

Se emplearon ratas Sprague-Dawley de 300-350 gr, las cuales fueron anestesiadas con una mezcla de Fluotano/ CO_2/O_2 (1.5 % /90 % / 5 %) para la implantación quirúrgica de una cánula-guía (18 ga) colocada a 1 mm por arriba del estriado. La recuperación post-quirúrgica de los animales fue invariablemente de una semana. Después de este intervalo de recuperación, los animales se emplearon para la inyección del precursor radiactivo. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas para la implantación de la cánula-guía y la inserción de la cánula de inyección fueron tomadas del atlas del cerebro de la rata de Watson y Paxinos (1995).

Inyección intracerebral del aminoácido ^{35}S -Metionina, empleado como precursor metabólico de la síntesis de proteína en el estriado de la rata

Para inyectarles la ^{35}S -Metionina, las ratas implantadas con la cánula-guía fueron anestesiadas con una mezcla de Fluotano/ CO_2/O_2 , fijadas estereotáxicamente y sujetas a una inyección única en el núcleo estriado de 10 μ Ci/3 μ l/15 min de ^{35}S -Metionina (1180 Ci/mole, Amersham). La inyección del precursor radiactivo se

llevó a cabo mediante la inserción de una cánula de infusión *push* a la cánula-guía implantada en el animal, misma que fue acopiada a una jeringa Hamilton de 10 μ l y a una bomba de microinfusión (Harvard). La velocidad de inyección del trazador se realizó a 0.2 μ l/min.

Determinación del curso temporal de incorporación del trazador radiactivo a material protéico tisular en el estriado de la rata

Diferentes grupos de animales ($n = 2$) fueron sacrificados por dislocación cervical en diferentes tiempos después de la inyección del trazador radiactivo (v.g., 0.5, 1.5, 4.0, 8.0, 12.0 hr). Los estriados de los diferentes grupos de ratas inyectadas fueron disectados del cerebro y homogeneizados a 4°C con una solución de NaCl 127 mM, KH_2PO_4 1.18 mM, MgSO_4 1.18 mM, NaHCO_3 20 mM, D-glucosa 2g/l (aprox. 40 mg tejido/ml de solución). Los homogeneizados de tejido fueron posteriormente centrifugados a 10,000 rpm/15 min en una microfuga de mesa (Microfuge 12, Beckman), y los sobrenadantes fueron recuperados y precipitados inicialmente en una solución de 10 % de TCA (Baker)/10mM/L-Metionina (Merck). Las pastillas de material protéico recuperadas después de esta precipitación inicial fueron resuspendidas en 1.0 ml de una solución de 0.1 N de NaOH y estuvieron invariablemente sujetas a 9 ciclos adicionales de resuspensión/precipitación/centrifugación/resuspensión de acuerdo con la técnica estándar establecida por Mans y Novelli (1960), modificándose los tiempos de incubación de las pastillas precipitadas en tubos de polietileno Eppendorf de 1.5 ml. Durante los tres últimos ciclos (7-9) las pastillas fueron resuspendidas e incubadas a 37°C/30 min, en 1.0 ml de solución de éter-etanol (1:1, V:V) (Baker), centrifugadas y resuspendidas subsecuentemente a la misma temperatura, en un volumen similar de solución de éter (Baker). Finalmente, las pastillas secadas a temperatura ambiente fueron resuspendidas en un 1.0 ml de solución de NaCl 0.15 M/NaOH 0.1N (10:1, V:V). Durante cada ciclo de precipitación/resuspensión se tomaron por duplicado alícuotas de 40 μ l de cada uno de los sobrenadantes obtenidos durante los ciclos de precipitación y resuspensión del material protéico precipitado por TCA para cuantificar la cantidad de cpm del trazador incorporado a proteína tisular y, asimismo, se tomaron por duplicado alícuotas de 80 μ l para cuantificar, por el método de Lowry, la concentración de proteína total en las fracciones de homogenado (HOM), las sobrenadantes (S_1) y las pastillas precipitadas con TCA (P_1, P_2) y resuspendidas con 0.1 NaOH/0.15M de NaCl (P_{10}). Los valores de la cantidad de trazador radiactivo incorporado a material protéico precipitable por TCA fueron referidos en cpm/mg de proteína (ver el diagrama de flujo).

Animales de experimentación y cirugía estereotáxica para la perfusión push-pull

Se emplearon ratas Sprage-Dawley de 300-350 gr, las cuales fueron anestesiadas con una mezcla de Fluotano/ CO_2/O_2 (1.5 % /90 %/5 %) para la implantación quirúrgica de una cánula-guía (18 ga) colocada a

1 mm por arriba del estriado. La recuperación post-quirúrgica de los animales fue invariablemente de una semana. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas para la implantación de la cánula-guía y la inserción de la cánula de perfusión *push-pull* fueron tomadas del atlas del cerebro de la rata de Watson y Paxinos (1995).

Sistema de perfusión intracerebral in vivo

Para la perfusión *in vivo* se insertó una cánula de infusión-extracción de líquido *push-pull* (21 ga), diseñada para perfundir un área tisular de 1-2 mm^2 (ver el diseño de la cánula de perfusión). Para la infusión de soluciones químicas al tejido nervioso, esta cánula fue conectada a una bomba peristáltica que permitió la infusión secuencial de una solución estándar de líquido fisiológico artificial (NaCl 127 mM, KH_2PO_4 1.18 mM, MgSO_4 1.18 mM, NaHCO_3 20 mM, D-glucosa 2g/l, BSA 0.1 %) ya sea con una concentración normal (3.70 mM) o despolarizante (50 mM) del ion K^+ . Tanto la infusión (velocidad de flujo a 50 μ l/min) del líquido de perfusión como la extracción del mismo (velocidad de flujo a 100 μ l/min), se hicieron mediante la conexión de la cánula de perfusión a una bomba peristáltica de 4 canales (Manostat, Thomas), cuyo sistema de extracción permaneció abierto a la presión atmosférica (Bayón y col., 1986).

La dependencia de la liberación de material protéico inducida por la estimulación química despolarizante con alto potasio del tejido nervioso se evaluó en algunos experimentos mediante la adición a la solución estándar de perfusión de 100 μ M de EGTA o 50 μ M del antagonista VERAPAMIL. Las fracciones de perfusado fueron recogidas en tubos de polietileno cada cuatro minutos, colectándose un volumen promedio, por fracción, de 380 ± 30 μ l durante 4 hr de perfusión continua. El material protéico liberado en las distintas fracciones de perfusado fue precipitado a través de la adición de una solución de 15 % de ácido tricloro-acético (1:1, V:V), y congelado a -20°C para su análisis ulterior.

Cuantificación de la incorporación del trazador radiactivo a material protéico sintetizado y secretado en los perfusados del estriado de la rata

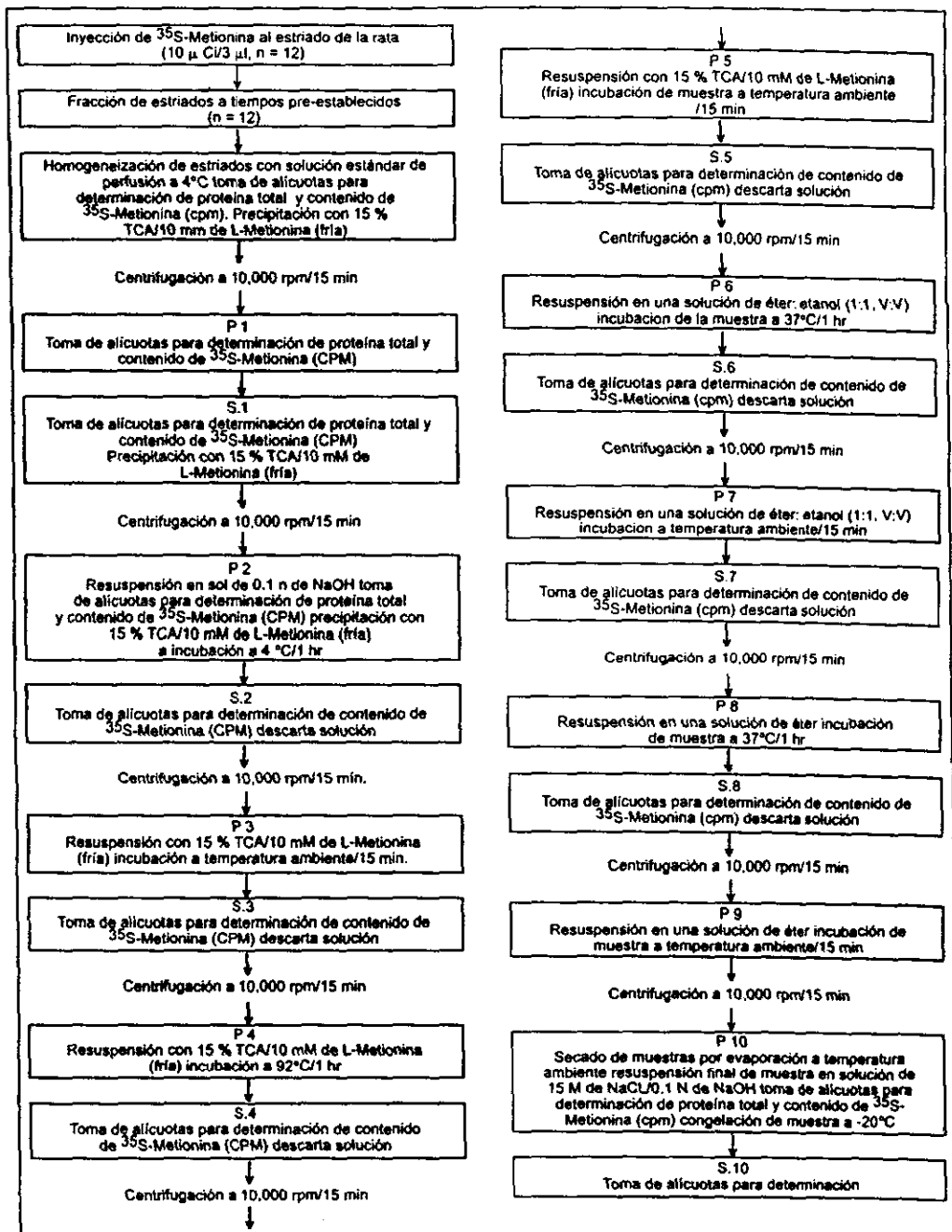
El material protéico marcado con el precursor radiactivo, recogido en fracciones de perfusado bajo condiciones experimentales de perfusión basal (no despolarización) y de perfusión despolarizante con la alta concentración de potasio, fueron procesados y sujetos a los mismos métodos de cuantificación que los descritos anteriormente para los homogeneizados y sobrenadantes del tejido nervioso (ver arriba en la sección "Determinación del curso temporal de incorporación de ^{35}S -Metionina").

Resultados

Incorporación del trazador radiactivo ^{35}S -Metionina a material protéico tisular en el estriado de la rata

El nivel máximo de incorporación del aminoácido ^{35}S -Metionina a material protéico tisular en las fracciones precipitadas con TCA y en los homogeneizados de te-

DIAGRAMA 1
 Diagrama de flujo de los ciclos de centrifugación/precipitación
 y resuspensión de los homogeneizados de los estriados de rata
 [Modificación realizada a la metodología original descrita por Mans y Novelli (1960)]

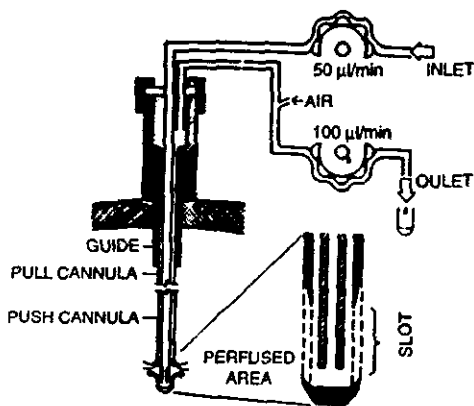


jido estriado-palidal, se observó a las 8 horas posteriores a la inyección local de este precursor en el estriado de la rata. La determinación del tiempo óptimo de in-

corporación del trazador al material protéico sirvió para establecer el tiempo de inicio del estudio de la liberación *in vivo* de material protéico recién sintetizado en

DIAGRAMA 2

Diagrama de sistema de perfusión *push-pull*. El diseño básico de la cánula de perfusión es la de Gaddum-Myers (izq). La tubería de infusión (*inlet*, blanco) y de extracción (*outlet*, punteado) están formadas por dos tubos concéntricos de acero inoxidable que forman el largo de la cánula. Ambas tuberías se separan en la cámara superior (negro). La cánula guía usada en nuestros experimentos está diseñada con un sistema "broche" que asegura la inserción de la cánula de perfusión. El inserto muestra la cánula modificada por nuestro grupo (Bayón y col., 1986) donde se muestra la porción terminal de la cánula de hendidura (*slot*). El sistema de perfusión consta de un sistema de bombeo abierto a la presión atmosférica (entrada de aire = 0.5 mm dm). El flujo del sistema de extracción es el doble del sistema de infusión.



esta estructura cerebral (figura 1). La inyección del precursor metabólico fue constante a lo largo del curso temporal de incorporación del trazador a proteína tisular ($29.44 \pm 0.93 \times 10^{-6}$ cpm de ^{35}S -Metionina / $3 \mu\text{l}/15$ min, $n = 6$), recuperándose un 80 % (78.5 %) ($23.08 \pm 0.34 \times 10^{-6}$ cpm) de ^{35}S -Metionina con respecto al total de marca aplicada *in situ*. Asimismo, se observó que sólo 15.2 ± 1.7 % ($3.53 \pm 0.17 \times 10^{-6}$ cpm) del ^{35}S -Metionina capturado por el tejido, se encontró en los homogeneizados de estriado extraídos a los diferentes tiempos indicados, y 1.35 ± 0.05 % ($0.31 \pm 0.013 \times 10^{-6}$ cpm) de ^{35}S -Metionina se encontró en las pastillas precipitadas con TCA (esto es 10 % del trazador presente en los homogeneizados) (figura 1, inserto 2). Estos datos sugieren que, aproximadamente, 85 % del trazador aplicado al tejido nervioso fue removido del parénquima cerebral por el sistema venoso cerebral, ya que los estudios preliminares a lo largo del curso de estos experimentos habían mostrado que la inyección local de un volumen pequeño del precursor metabólico, no era difundido a través del sistema ventricular cerebral a regiones contralaterales y regiones caudales del parénquima cerebral (datos no mostrados). Asimismo se observó una muy discreta variabilidad durante la determinación de proteína tisular en las fracciones de homogenados (2.01 ± 0.71 mg/ml de solución estándar

DIAGRAMA 2a

Fotografía de alta ampliación del estriado de la rata (250 x). Se muestra la colocación intracerebral de la cánula de perfusión *push-pull*, donde la punta de la cánula alcanza el borde inferior del estriado de la rata (área oscura). Un corte coronal del estriado de la rata fue obtenido mediante la fijación previa del tejido cerebral con paraformaldehído al 4 %, y se hicieron cortes seriados de $40 \mu\text{m}$ en un microtomo. La sección mostrada de tejido fue teñida previamente con hematoxilina-eosina para identificar el sitio correspondiente al área tisular de perfusión.



de perfusión) y en las fracciones precipitadas cuantitativamente con 15 % de TCA (0.69 ± 0.18 mg/ml de solución de resuspensión (0.15 M NaCl/0.1 N NaOH)). La recuperación de proteína tisular posterior a la precipitación con 15 % de TCA fue del orden de 25-30 % (figura 1, inserto 1).

Inyección intracerebral del aminoácido ^{35}S -Metionina empleado como precursor metabólico para la síntesis y la liberación de material protéico

Con base en los resultados experimentales obtenidos sobre el tiempo máximo de incorporación de ^{35}S -Metionina a proteína tisular, la perfusión *in vivo* del estriado de la rata mediante la técnica de perfusión *push-pull*, se inició 6 hr después de la inyección del precursor metabólico (^{35}S -Metionina). Durante el curso de las perfusiones ($n = 6$) se observó una liberación inicial significativa del precursor radiactivo incorporado a material protéico precipitado con TCA durante la primera sesión de estimulación del tejido nervioso con alto K^+ (203 % sobre el nivel de liberación basal); en tanto que durante la segunda (K^+/EGTA) y tercera estimulación ($\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$) (figura 2, inserto 1) se observó una liberación proporcional del precursor radiactivo incorporado a material protéico liberado y precipitado cuantitativamente con 15 % de TCA (60 % sobre el nivel de liberación basal). Estos resultados hacen plausible proponer la existencia de una poza intracelular saturable de material protéico que es liberable bajo la estimulación química del tejido nervioso. Asimismo, tampoco se podría descartar la posible presencia de diferentes pozas intracelulares conteniendo diferentes fracciones de material protéico, que bajo condiciones de estimulación

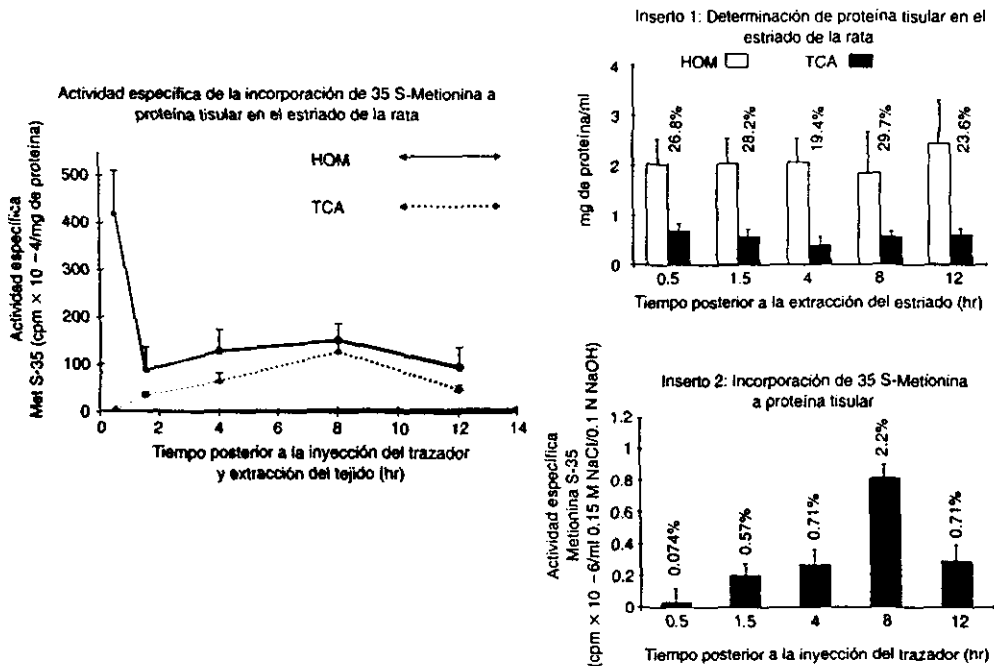


Figura 1. Actividad específica de ³⁵S-Metionina en secciones de tejido estriatal homogeneizado y precipitado con TCA. Las ratas Sprague-Dawley fueron expuestas a un pulso único de ³⁵S-Metionina (10 μ Ci/3 μ l/15 min). Los estriados de las ratas fueron extraídos a los tiempos seleccionados. Las fracciones de homogeneizados fueron precipitadas con una solución de 15 % de TCA y 10 mM de L-Metionina. La actividad específica estimada (ordenadas) de las muestras de homogeneizado y de las fracciones precipitadas se obtuvo a partir de la determinación del contenido de ³⁵S-Metionina y del contenido de proteína tisular en cada una de las regiones de estriado obtenidas después de la extracción del tejido. La determinación de proteína tisular en las fracciones de homogeneizados y de las fracciones precipitadas con TCA se midió por duplicado por el método de Lowry (inserto 1). La recuperación de proteína tisular total precipitada con TCA se expresa en valores porcentuales (inserto 1). El contenido de ³⁵S-Metionina incorporada a la proteína tisular precipitada (inserto 2) se cuantificó por duplicado en un aparato de líquido de centelleo. Los valores porcentuales obtenidos representan la fracción de ³⁵S-Metionina incorporada a proteína tisular con respecto a la cantidad de trazador depositado en el estriado de la rata (23.08×10^6 cpm, ver en resultados) (promedio \pm intervalo, n = 2).

no despolarizante o despolarizante continua se produjera una depleción de la fracción protéica liberable en estas pozas celulares (v.g., vesículas exocíticas) y por tanto requiriera de la maquinaria biosintética para sintetizar *de novo* el material protéico depletado cuando el tejido es continuamente estimulado (De Potter y col., 1995). Estos resultados permitieron, a su vez, cuantificar la fracción de proteína tisular liberada al espacio extracelular de sus respectivas pozas intracelulares, estimándose que sólo una fracción del 3 % al 5 % del material protéico tisular sintetizado *de novo* es liberable cuando el tejido nervioso es despolarizado químicamente con un alto K⁺ (cuadro 1) (figura 2).

La despolarización del estriado de la rata con alto potasio (50 mM) induce un incremento importante (40 μ g/ml) sobre el valor basal promedio (25 μ g/ml) del material protéico total liberado en los perfusados. Una gran proporción de este material protéico liberable bajo la estimulación despolarizante del tejido nervioso es recuperado después de la precipitación cuantitativa con 15 % de ácido tricloroacético (TCA) (70-80 %). Se ob-

tuvieron los mismos valores porcentuales con la precipitación de las fracciones de perfusado colectadas en condiciones de estimulación basal, en fracciones de sobrenadantes obtenidos de la homogeneización del estriado de la rata y fracciones de proteína sérica de bovino, BSA (dato no mostrado). Estos resultados hacen factible proponer, inicialmente, la existencia de componentes de alta masa molecular en este material protéico liberado (proteínas con peso molecular promedio $\geq 15,000$ daltones). Más aún, el incremento en la liberación de material protéico total inducido por la despolarización química resultó ser dependiente de la concentración de calcio extracelular (1.8 mM), como observó preliminarmente Bayón y col. (1986), lo cual hace factible proponer, inicialmente, el posible origen neuronal de este material de naturaleza protéica (figura 3).

Adicionalmente, un resultado que apoya nuestra hipótesis del origen neuronal del material protéico total liberable por despolarización química con alto potasio, es la inhibición casi total (98 %) observada en el incremento de la liberación protéica inducida por la perfu-

CUADRO 1

Determinación de la incorporación de metionina S-35 a proteína tisular liberada bajo estimulación química del estriado. (CPM de metionina S-35/ml de 0.1 N NaOH-0.15 M de NaCl)		
No. de estimulación	Promedio (sobre basal)	D.S. (n = 6)
1a. estimulación	1285.4	306.3
2a. estimulación	356.4	63.1
3a. estimulación	380.9	139.2
Determinación de proteína total liberada del estriado de la rata y precipitada con 15 % de TCA. (UG de proteína total TCA PPTADA/ml de solución 0.1 N NaOH-0.15 M NaCl)		
1a. estimulación	38.36	3.18
2a. estimulación	17.67	4.18
3a. estimulación	22.26	7.28

CUADRO 1 (continuación)

Actividad específica del material protéico liberado al espacio extracelular mediante la estimulación química depolarizante del tejido estriado. (CPM de metionina S-35/UG de material protéico detectado por Lowry)		
1a. estimulación	33.5	7.98
2a. estimulación	20.2	3.6
3a. estimulación	17.11	6.25
Fracción de proteína tisular sintetizada en el estriado de la rata liberada bajo la estimulación química depolarizante del tejido neuronal. (Actividad específica de la proteína liberada/actividad específica de la proteína tisular)		
1a. estimulación	4.89	1.16
2a. estimulación	2.95	0.526
3a. estimulación	2.5	0.913

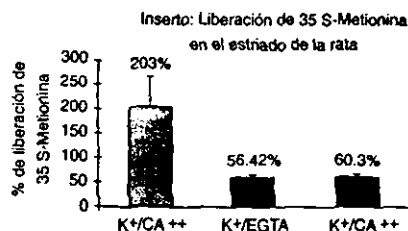
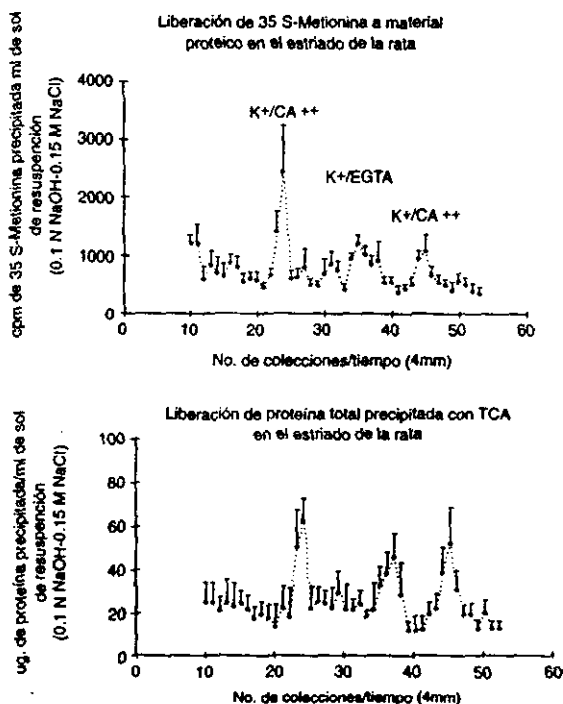


Figura 2. Liberación de metionina S-³⁵ incorporada a material protéico precipitado con TCA en el estriado de la rata. Las ratas Sprague-Dawley fueron implantadas esterotáxicamente con una cánula guía. Posteriormente las ratas Y1 fueron inyectadas individualmente a la región anatómica del caudo-putamen con ³⁵S-Metionina (10 uCi/3 uI/15min). Seis hr de la inyección del trazador, los animales fueron perfundidos y se colectaron las fracciones de perfusado. Durante las condiciones de reposo (no despolarización) y de estimulación química despolarizante del tejido, los perfusados fueron analizados para su contenido de ³⁵S-Metionina (panel superior) y para la determinación del contenido de proteína precipitada por TCA por el método de Lowry (panel inferior). Las determinaciones de met S-35 y de proteína precipitada se llevaron a cabo por duplicado/animal. Los valores de las gráficas están expresadas en cpm de ³⁵S-Metionina precipitada/ml de volumen de resuspensión (0.1 N NaOH/0.15 M NaCl) y ug de proteína total precipitada /ml de solución de resuspensión (0.1 N NaOH/0.15 M NaCl). El inserto (panel superior) muestra la fracción porcentual de liberación de ³⁵S-Metionina incorporada a material protéico perezipitable por TCA. Durante las fases de estimulación química del estriado (promedio +/-D.S. n = 6).

Liberación de proteína total y proteína precipitada con TCA en el estriado de la rata

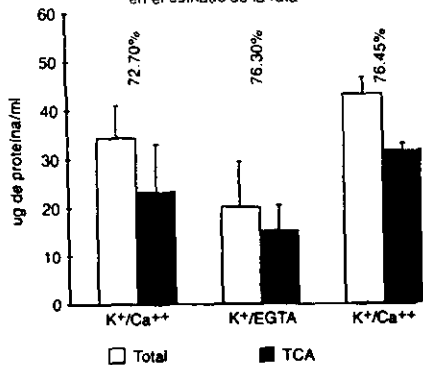


Figura 3. Valores de los incrementos netos de proteína liberada por despolarización dependiente de la presencia de calcio extracelular. Las ratas Sprague-Dawley fueron perfundidas en el área del caudo-putamen. Nótese el importante incremento (80 % sobre el valor basal) en la secreción del material proteico inducido mediante la infusión de líquido de perfusión estándar con una concentración despolarizante del ion k⁺ (50 mM) y Ca⁺⁺(1.8 mM) (1a. y 3a. estimulación). Por el contrario, se observó un decremento del 50 % en la liberación de proteína total en condiciones despolarizantes con un líquido de perfusión de k⁺ 50 mM en ausencia de Ca⁺⁺ en adición de 100 μM del quelante de cationes divalentes EGTA (2a. estimulación). Las fracciones colectadas fueron precipitadas con 15 % de TCA. La proteína liberada se determinó por duplicado por el método de Lowry. Los valores porcentuales (%) representan la fracción de recuperación de proteína total precipitada por TCA en las fracciones de perfusado colectadas posteriormente a la estimulación química del tejido. Las gráficas se expresan en ug de proteína/ml de vol de perfusado o en ml de solución de resuspensión (0.1 N NaOH/0.15 M NaCl) de las muestras precipitadas por TCA (promedio ± D.S. n = 3).

sión del estriado de la rata con una solución de alto potasio en presencia del verapamil (50 μM), una sustancia química empleada para bloquear la conductancia del ion Ca⁺⁺ al compartimiento citoplasmático neuronal (antagonista de los canales de Ca⁺⁺, tipo L) (Lopez GM y col., 1989) (figura 4).

Discusión

Las sustancias neuroactivas, como las aminas biogénicas y los péptidos bioactivos, y las hormonas de naturaleza peptídica son secretados al espacio extracelular mediante la vía de secreción regulatoria, donde diferentes moléculas de naturaleza proteica, localizadas en membranas de vesículas exocíticas (Valtorta y col., 1992; Walaas y col., 1989), en el citoplasma (Shahid y col., 1989; Almers y Tse, 1990) y en el exolemma (Jena y col., 1994) regulan la segregación del material contenido en las vesículas endocíticas para su secreción ulterior (Sabatini y col., 1982; Burke y col., 1997; Normant y Lou, 1998; Kaether y col., 1997; Goodall y col., 1997). Bajo este lineamiento, diversas moléculas peptídicas (v.gr., cromograninas A, b y

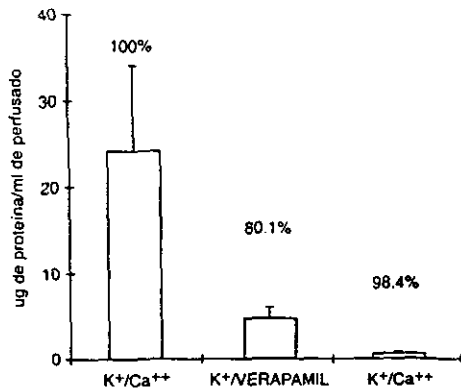


Figura 4. Valores de los incrementos netos de proteína total liberada por despolarización en presencia del verapamil. Las ratas Sprague-Dawley fueron perfundidas en el área del caudo-putamen. La infusión de líquido de perfusión con una concentración despolarizante de 50 mM del ion k⁺ en presencia de 1.8 mM de Ca⁺⁺, incrementó la liberación de proteína total cuantificada por el método de Lowry (1a estimulación). Durante la 2a. estimulación, se observó un decremento importante (80 %) de la proteína total liberada del caudo-putamen perfundido con líquido de perfusión despolarizante (k⁺ 50 mM) en presencia de 50 μM de verapamil (antagonista específico de canales de calcio) y en ausencia del Ca⁺⁺. Los valores porcentuales (%) muestran el efecto de inhibición sobre la liberación de proteína total inducida por el antagonista. Las gráficas se expresan en ug de proteína total precipitada/ml de solución de perfusado (promedio ± D.S. n = 3).

secretogranina II, secretoneurina) (Eider U y col., 1997), factores neurotróficos (Kruttschgen y col., 1998; Fawcett y col., 1998; Liou y col., 1997) y sustancias de alta masa molecular, como proteoglicanos (Dow y col., 1994), glucoproteínas (v.gr., SCO-spondina) (Monnerie y col., 1997), AchE, dopamina beta-hidroxilasa (DBH) (De Potter y col., 1995; Pau y col., 1997; Berridge y col., 1997; Blessing y col., 1998), el inhibidor de los activadores de plasminógeno y plasmina, y la neuroserpina (Osterwalder y col., 1998) han sido localizadas a nivel celular y extracelular en diferentes segmentos del tejido nervioso, incluyendo el sistema ventricular, demostrándose que su secreción exocítica es dependiente de la concentración extracelular del ion Ca⁺⁺ (Agapito y col., 1998; Biagioni y col., 1995). Asimismo, las células neuronales son capaces de regular la síntesis y secreción de péptidos bioactivos liberados bajo la acción de estímulos despolarizantes (Cannosa y col., 1997) como moléculas de alta masa molecular (v.gr., AchE, DBH) (Ledbetiler y Kirschner, 1981; Taylor y col., 1989; Biagioni y col., 1995; De Potter y col., 1995).

Nuestros estudios experimentales han demostrado la existencia de material proteico liberado bajo condiciones de estimulación química del tejido nervioso. La liberación de este material de alto peso molecular resultó ser dependiente de la concentración extracelular de Ca⁺⁺ cuando el tejido es despolarizado con alto K⁺ (50 mM), lo que sugiere que este material liberado por las células neuronales es secretado bajo los mismos mecanismos moleculares de secreción impuestos para

otras sustancias bioactivas de menor peso molecular (v.gr., neurotransmisores peptídicos y no peptídicos). Más aún, la secreción de este material dependiente de Ca^{2+} , apoya el origen neuronal del material protéico sintetizado y liberado bajo estimulación química despolarizante del tejido nervioso y no un origen glial, como se ha reportado para la secreción de neurotransmisores no peptídicos (v.gr., GABA), donde su liberación al espacio extracelular ocurre en forma independiente a la presencia del ion Ca^{2+} (Sitges, 1989). Los estudios recientes muestran que una vez secretada la AchE al medio extracelular (Biagioni y col., 1995), esta molécula es recapturada por neuronas dopaminérgicas a través de un transportador membranar selectivo (Dickie y col., 1995). Asimismo, diversas proteínas, como la DBH, y la secretogranina I y II, han sido localizadas en vesículas de centro denso (*large dense core vesicles*, LDL) conjuntamente con neurotransmisores peptídicos (v.gr., VIP, Met-enkefalina, el péptido NPY) y neurotransmisores no peptídicos (noradrenalina NA; Acetilcolina, Ach), donde la estimulación intermitente a bajas y altas frecuencias producen una liberación cuantitativa de estas moléculas bioactivas, lo que permite sugerir que estas vesículas están relacionadas con la secreción del material protéico inducida por la estimulación del tejido nervioso (De Potter y col., 1995; Goodall y col., 1997).

Se han empleado rutinariamente diferentes precursores metabólicos (aminoácidos radioactivos) para cuantificar y determinar *in vitro* (Duffy y col., 1981; Hesse y col., 1984; Sweadner y col., 1981, 1983*, 1983^b; Patterson y col., 1978; Heydom y col., 1985) e *in vivo* (Wouters y col., 1998; Nixon y col., 1994; Dow y col., 1994) la síntesis, el transporte axonal anterogrado (Heslop y col., 1975; Lasek, 1977; Forman y col., 1977) y el transporte dendrítico (Globus y col., 1968; Lux y col., 1970; Kreuzberg y Toth, 1974) de diferentes macromoléculas de naturaleza protéica en el sistema nervioso de vertebrados e invertebrados, que resultan ser indistintamente secretados al medio extracelular ya sea mediante la estimulación química despolarizante del tejido o la estimulación eléctrica del mismo (Musick y Hubbart, 1972; Musick, 1979; Kaczmarek y col., 1975; Appletauer y Korr, 1975; Hines y Garwood, 1977; Tedechi y col., 1981; Kler y Rosen, 1985). Bajo este contexto, el empleo de un precursor metabólico como el aminoácido ^{35}S -Metionina en nuestro estudio permitió detectar y cuantificar con excelente resolución la presencia de material protéico liberable a perfusados colectados durante la perfusión *in vivo* del tejido nervioso de la rata en condiciones de estimulación no despolarizante (basal) y despolarizante en el estriado de la rata. Por lo tanto, la existencia de una gran cantidad de sustancias bioactivas de alto peso molecular que ejercen funciones biológicas específicas en el sistema nervioso de mamíferos, y que son secretadas al espacio extracelular por terminales presinápticas o secreción dendrítica o somática (v.gr., AchE, Greenfield,

1984; la neuroserpina Osterwalder y col., 1998) permite proponer que el material protéico sintetizado y liberado por la despolarización química del tejido neuronal en nuestros estudios, pudiera enmarcarse dentro del grupo de sustancias bioactivas con funciones regulatorias similares a las reportadas previamente o enmarcarse dentro de un grupo nuevo de moléculas bioactivas con propiedades funcionales aun desconocidas con capacidad de regular o modular la neurotransmisión sináptica en el sistema nervioso central de los mamíferos.

Conclusiones

1. El empleo de la técnica de perfusión *in vivo push-pull* en combinación con procedimientos de incorporación de precursores metabólicos radiactivos permite detectar y cuantificar cambios en la síntesis y liberación *in vivo* del material protéico total en el estriado de la rata.
2. Esta metodología experimental nos ha permitido identificar y cuantificar la liberación inducida por despolarización química de material de naturaleza protéica cuya concentración es alta en el espacio extracelular del tejido nervioso del estriado de la rata, lo cual hace factible diseñar estrategias que permitan abordar futuros estudios enfocados a la identificación y la caracterización molecular de una familia de nuevos componentes macromoleculares protéicos con posibles acciones neuromoduladoras.
3. Asimismo, la gran abundancia del material protéico liberable por despolarización, también permite proponer la existencia hipotética de nuevas macromoléculas protéicas diferentes a los ya conocidos mensajeros peptídicos de bajo peso molecular, cuya concentración en el espacio extracelular en el tejido nervioso oscila normalmente en órdenes de magnitud de 1000-10,000 veces menor que el material protéico total estimado en nuestros perfusados.
4. Nuestros resultados muestran que la liberación inducida de material protéico total y de recién síntesis por alto potasio es dependiente del calcio extracelular, lo cual hace factible proponer, al menos basados en este criterio que apoya el concepto de la liberación sináptica de transmisores químicos en el sistema nervioso, el origen neural de una gran proporción del material protéico liberable por despolarización en nuestros experimentos.

Agradecimientos

Proyecto financiado por Funsalud y por el Instituto Mexicano de Psiquiatría.

1. ALMERS W, TSE FW. Transmitter release from synapses does a preassembled fusion pore initiate exocytosis? *Neuron*, 4:813-18, 1990.
2. APPELTAUER GSL, KORR IM: Axonal delivery of soluble, insoluble and electrophoretic fractions of neuronal proteins to muscle. *Exp Neurol*, 46:132-146, 1975.
3. BAYON A, DRUCKER-COLIN R, LUGO I, SHOEMAKER WJ, AZAD R, BLOOM FE: Enkephalin release from the globus pallidus: *in vitro* and *in vivo* studies. En: *Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission*. R Tapia, W Cotman (eds.). Plenum Press, Nueva York, 29-41, 1981.
4. BAYON A, SOLANO S, ANTON B, CASTAÑO I, DIAZ-PONTONES D: Push-pull perfusion studies on the *in vivo* release of proteins, enzymes and the neuroactive peptides-enkephalins from the rat brain. En: *In vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances*. (Bayon A y Drucker-Colin R (eds.)). Academic Press Inc., Nueva York, 69-93, 1985.
5. BAYON A, ANTON B, LEFF P, SOLANO S: Release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins, from the striatum of the freely moving rat. En: *Neurochemical Analysis of the Conscious Brain: Voltametry and Push-Pull Perfusion*. Myers RD, Knott PJ (eds.). Annals. Nueva York. Acad Sci, 473:401-18, 1986.
6. BERRIDGE CW, STRATFORD TL, FOOTE SL, KELLEY AE: Distribution of dopamine-beta-hydroxylase-like immunoreactive fibers within the shell subregion of the nucleus accumbens. *Synapse*, 27(3):230-41, 1997.
7. BHANU PJ, GUMKOWSKI DF, KONIEZCKO EM, VON MOLLARD GF, JAHN R, JAMIESON JD: Redistribution of a Rab3-like GTP-binding protein from secretory granules to the Golgi Complex in pancreatic acinar cells during regulated exocytosis. *J Cell Biol*, 124:43-53, 1994.
8. BIAGONI S, BEVILLACQUA P, SCARCELLA G, VIGNOLI AL, AUGUSTI-TOCCO G: Characterization of acetylcholinesterase secretion in neuronal cultures and regulation by high potassium and soluble factors from target cells. *J Neurochem*, 64(4):1528-35, 1995.
9. BLESSING WW, LAPPI DA, WILEY RG: Destruction of locus coeruleus neuronal perikarya after injection of antidopamine-beta-hydroxylase immunotoxin into the olfactory bulb of the rat. *Neurosci Lett*, 243(1-3):85-88, 1998.
10. BURKE NV, HAN W, LI D, TAKIMOTO K, WATKINS SC, LEVITAN ES: Peptide release is limited by secretory granule mobility. *Neuron*, 19(5):1095-1102, 1997.
11. CANOSSAM, GRIESBECK O, BERNINGER B, CAMPANA G, KOLPECK R, THOENEN H: Neurotrophin release by neurotrophins implications for activity dependent neuronal plasticity. *Proc Natl Acad Sci*, 94(24):13279-86, 1997.
12. CHERAMY A, ROMO R, GLOWINSKI J: The relative roles of neuronal activity and direct presynaptic mechanisms in controlling the release of dopamine from cat caudate nucleus. En: *Neurochemical Analysis of the Conscious Brain: Voltametry and Push-Pull Perfusion*. Myers RD, Knott PJ, (eds.). Annals. Nueva York. Acad Sci, 473:80-91, 1986.
13. DE POTTER WP, KURZAWA R, MISEREZ B, COHEN EP: Evidence against differential release of neuropeptide Y, neuropeptide Y and dopamine -beta-hydroxylase from adrenergic nerves in isolated perfused sheep spleen. *Synapse*, 19(2):67-76, 1995.
14. DICKIE BG, BUDD TC, VAX D, GREENFIELD SA: Uptake of acetylcholinesterase by neurons in the *substantia nigra*. *Eur J Neurosci*, 7(3):351-57, 1995.
15. DELEPINE L, AUBINEU P: Plasma protein extravasation induced dura mater by stimulation of the parasympathetic sphenopalatine ganglion in the rat. *Exp Neurol*, 147(2):389-400, 1997.
16. DOW KE, LEVINE RL, SOLC MA, DASILVAO, RIOPELLE RJ: Axonal transport of proteoglycans in regenerating goldfish optic nerve. *Exp Neurol*, 126(1):129-37, 1994.
17. DUFFY C, TEYLER TJ, SHASHOUA VE: Long term potentiation in the hippocampal slice: Evidence for stimulated secretion of newly synthesized proteins. *Science*, 212:1148-51, 1981.
18. FAWCETT JP, BAMJI SX, CAUSING CG, AOYZ R, ASE AR, READER TA, MCLEAN JH, MILLER FD: Functional evidence that BDNF is an anterograde neuronal trophic factor in the CNS. *J Neurosci*, 18(8):2808-21, 1998.
19. FISCHER-COLBRIE R, LASLOP A, KIRSHCMAR R: Secretogranin II, molecular properties, regulation of biosynthesis and processing to the neuropeptide secretoneurin. *Prog Neurobiol*, 46:49-70, 1995.
20. HERY F, FAUDON M, FUERI C: Release of serotonin in structures containing serotonergic nerve cell bodies: dorsalis raphe nucleus and nodose ganglia of the cat. En: *Neurochemical Analysis of the Conscious Brain: Voltametry and Push-Pull Perfusion*. Myers RD, Knott PJ, (eds.). Annals. Nueva York Acad Sci, 473:239-55, 1986.
21. GLOBUS A, LUX HD, SCHUBERT P: Somatodendritic spread of intracellularly injected ionized glycine in cat spinal motoneurons. *Brain Res*, 11:440-5, 1968.
22. GOODALL AR, DANKS K, WALKER JH, BALL SG, VAUGHAN PF: Occurrence of two types of secretory vesicles in the human neuroblastoma SH-SY5Y. *J Neurochem*, 68(4):1542-52, 1997.
23. GREENFIELD SA, CHERAMY A, LEVIEL V, GLOWINSKI J: *In vivo* release of acetylcholinesterase in the cat *substantia nigra* and caudate nuclei. *Nature*, 284:355-7, 1980.
24. GREENFIELD SA, GRUNEWALD DF, SHAW SG: Origin of various enzymes released from *substantia nigra* and caudate nuclei: Effects of 6-hydroxydopamine lesion of the nigro-striatal pathway. *J Comp Neurol*, 214:87-92, 1983b.
25. GREENFIELD SA, SHAW SW: Release of acetylcholinesterase and aminopeptidase *in vivo* following infusion of amphetamine into the *substantia nigra*. *Neurosci*, 7:2883-93, 1982.
26. GREENFIELD SA, CHUBB WI, GRUNEWALD DF, HENDERSON Z, PORTNOY JM, WESTON J, WRIGHT MC: A non-cholinergic function for acetylcholinesterase in the *substantia nigra*: Behavioral evidence. *Exp Brain Res*, 54:513-20, 1984.
27. GREENFIELD SA, CHERAMY A, GLOWINSKI J: Evoked release of proteins from the central nervous system *in vivo*. *J Neurochem*, 40:1048-57, 1983a.
28. GREENFIELD SA: A non-cholinergic action of acetylcholinesterase (AChE) in the brain: from neuronal secretion to generation of movement. *Cellular Mol Neurobiol*, 11(1):55-77, 1991.
29. HESLOP JP: Axonal flow and fast transport in nerves. *Adv Comp Physiol Biochem*, 6:75-113, 1975.
30. HESSE GW, HOFSTEIN R, SHASHOUA VE: Protein release from hippocampus *in vitro*. *Brain Res*, 305:61-66, 1984.
31. HEYDORN WE, NGUGEN KO, CREED JG, JACOBOWITZ DM: Effect of reduction cholinergic input on the concentration of specific proteins in different cortical regions of rat brain. *Brain Res*, 3:209-18, 1985.
32. HINES JF, GARWOOD MM: Release of protein from axon during rapid axonal transport: An *in vitro* preparation. *Brain Res*, 125:141-8, 1977.
33. HOFFMAN AF, VAN HORNE CG, EKEN S, HOFFER BJ, GERHARDT GA: *In vivo* microdialysis studies of somatodendritic dopamine release in the rat *substantia nigra*: Effects of unilateral 6-OHDA lesions and GDNF. *Exp Neurol*, 147(1):130-41, 1997.
34. JENSSON KP, CHUBB JN, SMITH AD: Intracellular localization of acetylcholinesterase in nerve terminals and capillaries of the rat cervical ganglion. *J Neurocytol*, 7:145-54, 1978.
35. KACZMAREK LK, ADEY WR: Extracellular release of cerebral macromolecules during potassium and low calcium-induced seizures. *Epilepsia*, 18:41-47, 1975.
36. KLER A, ROSEN A: Differences in the pattern of soluble proteins from rat brain regions. *J Neurochem*, 44(5):1333-9, 1985.
37. KREUTZBERG GW, TOTH L: Dendritic secretion: a way for neuron to communicate with the vasculature. *Naturwissenschaften*, 61:37, 1974.

38. KRUTTGEN A, MOLLER JC, HEYMACH JV, SHOOTER EM: Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proc Natl Sci USA*, 95(16):9614-19, 1998.
39. LASEK RJ, GAINER H, BARKER JL: Cell to cell transfer of glial proteins to the squid giant axon. *J Cell Biol*, 74:501-27, 1977.
40. LEDBETTER FH, KIRSCHNER N: Quantitative correlation between secretion and cell content of catecholamines and dopamine-beta-hydroxylase in cultures of adrenal medulla cells. *Biochem Pharm*, 30(23):3246-49, 1981.
41. LIQU JC, YANG RS, FU WM: Regulation of quanta secretion by neurotrophic factors at developing motoneurons in *Xenopus* cell cultures. *J Physiol*, 15:129-39, 1997.
42. LOPEZ GM, MORO A, CASTILLO FC, ARTALEJO R, GARCIA G: Variable voltage dependent and blocking effects of Nitrendipine, Verapamil, Diltiazem, Cinnarizine and Cadmium on Adrenomedullary secretion. *Br J Pharmacol*, 96:725-31, 1989.
43. LUX HD, SCHUBERT P, KREUTZBERG GW, GLOBUS A: Excitation and axonal flow: autoradiographic study on motoneurons intracellularly injected with 3H-aminoacid. *Exp Brain Res*, 10:197-204, 1970.
44. MANS RJ, NOVELLI GD: Measurement of incorporation of radioactive aminoacids into proteins by a filter paper disk method. *Archiv Biochem Biophys*, 94:48-53, 1960.
45. MUSICK JR, HUBBART JI: Release of protein from mouse motor nerve terminals. *Nature*, 237:279-81, 1972.
46. MUSICK JR: Correlated release of acetylcholine and proteins from neuromuscular junction. *Am J Physiol*, 236:C232-C255, 1979.
47. MONNERIE H, DASTUGUE B, MEINEL A: In vitro differentiation of chick spinal cord neurons in the presence of Reissner's fibre, and ependymal brain secretion. *Brain Res Dev Brain Res*, 102(2):167-76, 1997.
48. NIXON RA, LEWIS SE, MERCKEN M, SIHAG RK: [32P] orthophosphate and [35S] methionine label separate pools of neurofilaments with marked different axonal transport kinetics in mouse retinal ganglion cells in-vivo. *Neurochem Res*, 19(11):1445-53, 1994.
49. NORMANT E, LOH YP: Depletion of carboxypeptidase E and regulated secretory pathway sorting receptor causes misrouting and constitutive secretion of proinsulin and proenkephalin but not chromogranin A. *Endocrinol*, 139(4):2137-45, 1996.
50. OSTERWALDER T, CINELLI P, BAICI A, PENNELLA A, KRUEGER SR, SCHIRIMPF SP, MEINS M, SONDERGGER PJ: The axonally secreted serine proteinase inhibitor neuroserpin, inhibits plasminogen activator and plasmin but not thrombin. *Biol Chem*, 273(4):2312-21, 1998.
51. PAU KY, MAU YJ, YANG SP, AIRHART N, SPIES HG: Topographic comparison of the expression of the norepinephrine transporter, tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y mRNA in association with dopamine-beta-hydroxylase neurons in rabbit serum. *Brain Res Mol Brain Res*, 48(2):367-81, 1997.
52. PATTERSON PH: Environmental determination of autonomic neurotransmitter functions. *Ann Rev Neurosci*, 1:1-17, 1978.
53. PAXINOS G, WATSON C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academy Press, Nueva York, 1986.
54. SITGES M: Effect of organic and inorganic calcium channel blockers on gamma-amino-n-butirycacid release produced by monensin and veratrine in the absence of external calcium. *J Neurochem*, 53(2):436-41, 1989.
55. SWEADNER KJ: Environmentally regulated expression of soluble extracellular proteins from sympathetic neurons. *J Biol Chem*, 258:4063-70, 1981.
56. SWEADNER KJ: Size, shape and solubility of a class of releasable cell surface proteins of sympathetic neurons. *J Neurosci*, 3(12):2518-24, 1983a.
57. SWEADNER KJ: Post-translational modifications and evoked release of two large surface proteins of sympathetic neurons. *J Neurosci*, 3(12):2504-17, 1983b.
58. TAYLOR CS, FLEMING PJ: Conversion of soluble dopamine-beta-hydroxylase to a membrane binding form. *J Biol Chem*, 264(26):1542-46, 1989.
59. TEDESCHI B, WILSON DL, ZIMMERMANN, PERRY GW: Are axonally transported proteins released from sciatic nerve?. *Brain Res*, 211:175-178, 1981.
60. TOHEI A, WATANABE G, TAYA KJ: Hypersecretion of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in hypothyroid male rats as estimated with push-pull perfusion. *Endocrinology*, 156(2):395-400, 1998.
61. VALTORTA RF, BENFENATTI F, GREENGARD P: Structure and function of the synapsins. *J Biol Chem*, 267:7195-8, 1992.
62. WALAAS SI, BROWNING MD, GREENGARD P: Synapsin Ia, Synapsin Ib, Protein IIIa, protein IIIb, four related synaptic vesicles associated phosphoproteins share regional and cell localization in rat brain. *J Neurochem*, 51:1214-20, 1994.
63. WOUTERS BC, BOCK-SAMSON S, LITTLE K, NORDEN JJ: Up regulation of fast axonally transported proteins in retinal ganglion cells of adult rats with optic peroneal nerve grafts. *Brain Res Mol Brain Res*, 53(1-2):53-68, 1998.

**RESPUESTAS DE LA SECCION
AVANCES EN LA PSIQUIATRIA**

Autoevaluación

1. d
2. d
3. c
4. d
5. e
6. d
7. a
8. d
9. c
10. e
11. c
12. a
13. a
14. a
15. a

GENERAL DISCUSSION OF SESSION V

C. R. FREED: (*University of Colorado, Denver, CO*): There is a correlation between electrochemical responses in the dorsal raphe nucleus and the actual tissue concentrations of 5HIAA and serotonin. Peak response changes as percent of baseline show that 5HIAA has an exact correspondence to the electrochemical changes.

C. A. MARSDEN: (*Nottingham Medical School, Nottingham, U.K.*): With a second dose of haloperidol, there is no increase in dopamine release. Is "tolerance" the right word or is it simply that because of the dose used, the amount of dopamine available for release was depleted and the stores were not re-established?

The dose of 1.5 mg/kg is actually supramaximal for stimulating the firing activity of the cells, so there should be no difference between the firing of the neurons and the actual synthesis rate.

MARSDEN: Are effects on the firing rates the same as on dopamine release with that second dose?

G. DI CHIARA (*University of Cagliari, Cagliari, Italy*): Neuroleptics make active those units which are silent, and they also increase the basal firing rate of units. They are not necessarily the same type of units, although both are dopaminergic because of differences in the response to haloperidol.

M. PIERCEY (*Upjohn Company, Kalamazoo, MI*): Are you using the intravenous route? The electrophysiologic experiments that use the intravenous route show a large difference between intravenous and subcutaneous dosage.

DI CHIARA: For haloperidol, there's no difference between a subcutaneous dose and an intravenous dose because the blood-brain barrier is not crossed by haloperidol as quickly, and the drug is metabolized very slowly.

PIERCEY: Those who give haloperidol subcutaneously always need higher doses to show an effect and so electrophysiologic studies using the intravenous approach tend to be a lot more sensitive.

P. J. KNOTT: (*Mt. Sinai Medical Center, New York, NY*): When gamma-butyryl-lactone is given we see that an increase of Peak 2 occurs which we think is due to uric acid. In relation to pargyline, a decrease at Peak 2 occurs similar to the infusion of uricase close to the electrode.

Release of Proteins, Enzymes, and the Neuroactive Peptides, Enkephalins, from the Striatum of the Freely Moving Rat^a

ALEJANDRO BAYÓN,^{a,c} BENITO ANTÓN,^c
PHILIPPE LEFF,^b AND SARA SOLANO^c

^b Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70228
04510 México, D. F.

and

^c Instituto Mexicano de Psiquiatría
Secretaría de Salud
Calzada México-Xochimilco 101
Tlalpa, México, D. F.

INTRODUCTION

This paper deals with the *in vivo* release of proteins, enzymes, and peptides from the brain. These substances have been shown to be released from the nervous tissue and their possible roles in neural communication are a subject of increasing interest in neurobiology. Current evidence indicates that their availability at the release sites has a close dependence on the entire structure of the neuron, thus differing from nonpeptide messengers whose metabolism is mostly centered on the synaptic apparatus. Therefore, it seems to be particularly important to study peptide and protein release in integral neural pathways and circuits.

These studies are possible through the *in vivo* perfusion of deep brain nuclei, a technique that requires reliable probes and pressure buffering systems. We have designed a push-pull cannula with a slotted tip that, used with a pumping system open to the atmospheric pressure, minimizes the damage to the tissue and reduces flow obstructions during perfusion. This perfusion system has been tested using the release of proteins, peptides, and non-peptide transmitters as biochemical markers to assess tissue damage and viability. In this context, we present data on the *in vivo* release of protein material and several enzyme activities from the striatum, this release being induced by mechanical means or by chemical depolarization. We also give evidence

^aSupported in part by grants from CONACYT, Mexico, Instituto Mexicano de Psiquiatría and Fondo de Estudios e Investigaciones, R. J. Zebada.

of the *in vivo* release of the neuropeptides enkephalins, presenting results on the physiological regulation of this release in freely moving animals.

METHODS

Cannula

The basic design of the push-pull cannula used in these experiments is that of Gaddum,¹ as adapted by Myers.² Early work with this cannula in our laboratory gave a relatively high incidence of flow obstructions during perfusion, which were found to be due to the presence of tissue fragments or clogs obliterating the tip or the shaft of the pull part of the cannula. These obstructing materials are produced mainly by negative pressures developed at the perfused region and by the tissue-eroding effect of the stream of superfusing medium. The former effect is mostly dependent on the pressure balance of the pumping systems and can be successfully dealt with using a pull line open to the atmospheric pressure (FIGURE 1).³ The erosion depends mainly on the geometry of the cannula tip and has been minimized by keeping the end of the inner push cannula within the outer pull tubing.⁴⁻⁶ Although this type of design shields the tissue from the direct mechanical effects of the outflowing stream, it reduces the diffusion interface at the cannula tip to the size of the cross-sectional area of the outer cannula, making it necessary to use wider probes that are unsuitable for small laboratory animals. We have designed a new cannula tip (FIGURE 1) that besides providing the shielding effect previously noted, allows for a larger interface between the tissue and the perfusing medium, even using small-gauge cannulae. The push-pull cannula is constructed from 21-ga (thin wall) and 29-ga stainless-steel tubing (Small Parts Inc., Miami, FL). Before assembling the outer and inner tubings to form a concentric Gaddum-Myers system, the 21-ga pull tubing is obstructed at the tip with soldering material and two slots are drilled under microscopic control on the sides of the shaft, just above the tip.

Surgery

Albino rats (local Wistar strain) weighing 150-200 g were anesthetized with sodium pentobarbital. Surgery, under aseptic conditions, is limited to the stereotaxic implantation of a stainless-steel 18-ga cannula, which is chronically fixed with acrylic cement to the skull, serving as a guide for the acute insertion of the push-pull cannula (FIGURE 1). The lower end of the guide cannula is placed several millimeters above the brain region that will be reached by the tip of the push-pull cannula at the time of perfusion; this strategy avoids the gliosis found in the perfused area when the perfusing probe itself is chronically implanted into the brain.⁷ The upper end of the guide cannula (FIGURE 1) was modified by adding a clamping device to impede rotational or axial movements of the push-pull cannula after it is inserted; a tight fit between the outer pull cannula and the guide avoids other movements of the probe. After implantation, the lumen of the guide is temporarily blocked with a tight-fitting rod until the day

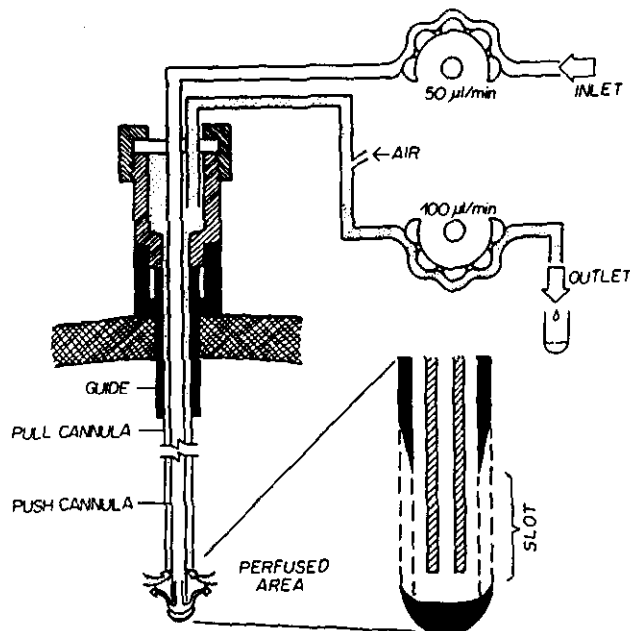


FIGURE 1. Push-pull perfusion system. The basic design of the cannula is that of Gaddum-Myers. The inlet (white) and outlet (dotted) tubing systems are concentric along the shaft of the cannula but separate after entering the upper chamber, which is constructed of two stainless-steel screwed pieces (dashed) and a rubber septum (white). The guide cannula used in our laboratory incorporates a clamping device (black) to fix the push-pull cannula. The inset shows the slotted tip (longitudinal section) of the push-pull cannula used in this work. The pumping system is open to the atmospheric pressure (air inlet = 0.3 mm diam.); the speed of the outflow pump is set to double the speed of the inflow.

of perfusion (1 week after surgery). During this time the implant is protected by a plastic cap covering the guide. The coordinates used for the globus pallidus and other brain regions were taken from the atlas of König and Klippel.¹

Perfusion Procedure

Implanted animals were placed in transparent plastic cages—their usual housing—in a quiet, isolated room 2 hr before the beginning of the session and remained in a freely moving situation throughout the perfusion. The animals were subjected to a single perfusion session. The protective mandrel was removed from the guide and the perfusing cannula slowly inserted and clamped in place. During early work in our laboratory the push and the pull ends of the cannulae were connected through polyethylene tubing to infusion and withdrawal syringes positioned in a Harvard reciprocating pump.^{8,10} Currently, a continuous superfusion system open to the atmospheric pressure has been adopted, using small-bore, thick-wall Silastic tubing and polystaltic cassette pumps (Manostat) (FIGURE 1).

The standard perfusion medium is a Krebs-Ringer bicarbonate buffer: 127 mM NaCl, 3.73 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.18 mM KH₂PO₄, 1.18 mM MgSO₄, 20 mM NaHCO₃, *d*-glucose 2 g/liter. Bovine serum albumin (BSA) (0.1%), and bacitracin (30 µg/ml) were included in the medium as protective agents for enkephalin release studies.¹¹ Chemical stimulation of the perfused tissue was produced by substituting K⁺ for Na⁺ ions in the standard medium to reach a 50 mM K⁺ concentration. From the onset the flow rate was held constant (25 µl/min or 50 µl/min, the effluent fractions being collected at 15 min or 4-min intervals, respectively, see figure legends). During the experiments, infused and collected fluid volumes were routinely measured and there was constant monitoring for the presence of blood in the effluent. Abnormal animal behavior (motor disturbances, persistent drowsiness, hyperactivity, excessive grooming, salivation, etc.) was also recorded. At the end of the perfusion, the position of the tip of the cannula was verified by inspection of frontal sections of the brain under a dissection microscope.

During the study of enkephalin release into the effluent medium, fractions were collected in plastic tubes containing 0.5 ml of 2.0 N ice-cold acetic acid in order to stop enzymatic degradation; these fractions were then boiled for 15 min, lyophilized, and resuspended in phosphate saline buffer for the enkephalin radioimmunoassay (RIA). When release of protein, enzyme activities, or radioactive tracers was studied, the perfusate fractions were aliquoted, frozen, and promptly assayed.

Assay of Biological Samples

Protein release was determined by the method of Lowry *et al.*,¹² using BSA as the standard; the reaction volume was reduced and the sample volume increased in order to improve the sensitivity of the assay. In some experiments protein was also measured using the method of Bradford.¹³ Lactic acid dehydrogenase (LDH) activity was determined using pyruvate as substrate.¹⁴ Also, in order to increase the sensitivity of the assay, incubation volume was reduced, sample volume increased, and reaction time extended to 24 hr. When assaying perfusate samples with low LDH activities

the initial velocities were linear for at least 12 hr and plots of enzyme concentration versus reaction velocity gave straight lines. Similar assay modifications also produced higher sensitivities when measuring acetylcholinesterase (AChE) (using acetylthiocholine iodide as substrate¹⁵) and protease activities (Hide powder azure as substrate¹⁶). Units of enzyme activity are expressed in nanomoles of substrate/hr. Only protease activity is expressed in absorbance units/24 hr.

In order to study the release of exogenous GABA, tritiated γ -aminobutyric acid ([³H]GABA, specific activity 34 Ci/mmol, Amersham) was added to the standard perfusion medium at the beginning of the perfusion (4–20 × 10⁶ cpm in 750 µl, perfused in 30 min). The [³H]GABA and metabolites not retained or taken up by the tissue were washed out during the 1–2 hr that followed. During this process and

TABLE I. Biochemical Parameters of Tissue Damage and Tissue Viability during Perfusion^a

	LDH	Protease	AChE	Protein	Enkephalin	[³ H]GABA
Globus Pallidus						
Depolarization induced release	105 ± 23	125 ± 25	134 ± 14	250 ± 62	235 ± 45	160 ± 30
Mechanically induced release	2010 ± 616	216 ± 65	284 ± 113	1700 ± 580	-	-
Caudate Putamen						
Depolarization induced release	114 ± 16	108 ± 19	240 ± 60	275 ± 24	-	-
Mechanically induced release	1870 ± 720	156 ± 18	660 ± 400	2500 ± 600	-	-

^aRelease was induced by depolarization with 50 mM K⁺ in the perfusing medium or, mechanically, by withdrawal and reinsertion of the push-pull cannula. Data are expressed as % variation coefficient (*N* = 4) of the resting release values. In the globus pallidus these control values (per ml of perfusate) were: LDH, 6.5 ± 2.7 units; proteases, 12 ± 1 units; AChE, 2.6 ± 0.4 units, and protein, 30 ± 4 µg. In the caudate putamen resting values were: LDH, 16.0 ± 4.2 units; proteases, 12.5 ± 2.0 units; AChE, 5.0 ± 0.9 units, and protein, 60 ± 20 µg.

^bEnkephalin and [³H]GABA release are increased to highly variable extents after acute mechanical lesions but, in contrast to the enzyme markers, subsequent release in response to depolarization is impaired.

throughout the rest of the perfusion, 10 µl aliquots from each collected fraction were counted in tritiosol¹⁷ to determine the resting and the evoked release of [³H]GABA. The fraction of the tritiated material in the perfusates that was contributed by [³H]GABA was determined by analysis of the samples in ion-exchange chromatography, followed by TLC.¹⁸ In spite of the fact that no inhibitor of GABA metabolism was added to the perfusing media, 60% of the tracer released during the third hour of perfusion was GABA. This proportion was reduced to 30% after the sixth hour. When release was evoked by depolarization, the fraction of counts coeluting with GABA was more than 50% higher than that found in perfusates obtained during resting conditions. Since these ratios remained constant in the different experimental conditions presented in this work, release data were calculated from uncorrected total counts per minute in the perfusate fractions.

The release of endogenous immunoreactive enkephalin was determined by RIA. In addition to the Leu-enkephalin RIA that we have previously reported,^{18,19} two new assays have been developed and used. Glutaraldehyde conjugates of BSA-Met-enkephalin and BSA-Leu-enkephalin were purified by gel filtration and emulsified in complete Freund's adjuvant. Antisera were raised in rabbits during a 3-month immunization schedule. Either ¹²⁵I- or ³H-labeled enkephalins were used as tracers and the free and bound enkephalins were separated with activated charcoal-dextran suspensions. When a final antiserum dilution of 1:1500 was used, the lowest detectable amounts of unlabeled enkephalins were 10-50 pg using ³H-labeled tracers, and 2-5 pg using ¹²⁵I-labeled tracers. Leu-enkephalin cross-reacts 8% in the Met-enkephalin assay and Met-enkephalin cross-reacts 0.3% in the Leu-enkephalin assay; enkephalin fragments and endorphins cross-react less than 0.1% in the Met-enkephalin assay and less than 0.001% in the Leu-enkephalin assay. Both the Met- and the Leu-enkephalin assays have been validated with tissue samples. In order to facilitate the comparison of the results presented here with previous reports from our laboratory, we show only the data obtained with Leu-enkephalin RIAs; nevertheless, similar results were obtained using a Met-enkephalin assay. Since the Leu-enkephalin RIAs also read Met-enkephalin, an "enkephalin unit" has been defined: it is the enkephalin immunoreactive material that produces a displacement of tracer in the assay equal to that observed with one picogram of synthetic Leu-enkephalin.¹⁸ All perfusate samples were assayed at two dilutions and in duplicate.

RESULTS

Release of Protein, Lactate Dehydrogenase, Proteases, Acetylcholinesterase, [³H]GABA, and Enkephalins as Biochemical Markers of Tissue Viability during In Vivo Push-Pull Perfusion of the Striatum

The need to assess the effect of perfusion on tissue viability has been fulfilled by using histological or electrophysiological controls of damage and functionality. However, it is often overlooked that biochemical markers released in the perfusate can give information on the tissue damage occurring during a perfusion session.^{20,21} Biochemical measurements also help to assess the functionality of the tissue during the course of a perfusion session, testing its capability for releasing exogenous and endogenous neurotransmitters. Thus, we have explored the suitability of several enzyme activities, total protein material, and representative peptide (enkephalin) and nonpeptide (GABA) transmitters as biochemical indicators of tissue damage and tissue responsiveness during *in vivo* perfusion of striatal regions. This study aims to differentiate substances that are only released after tissue damage from those that can be released through physiological mechanisms, placing special emphasis on enzymes and proteins. Later on, we describe how this information was used to compare the performance of the Gaddum cannula to that of a modified probe designed in our laboratory. Finally, we show results obtained with this cannula, regarding the physiological regulation of the release of messengers in the striatum.

Protein release into perfusates has been used earlier as a lesion marker.²¹ Since protein is always present in perfusates (because its normal level in the extracellular fluid of the nervous tissue is high^{22,23}) only marked surges of protein in perfusates

have been used as indicators of tissue damage. LDH is a soluble cytoplasmic enzyme, also normally found in plasma, which is the most widely used marker of tissue damage both in biochemistry and in clinical medicine. Its level in perfusates is expected to increase as a consequence of cell lysis (by tissue erosion or by rupture of capillaries) or after extravasation of serum (by edema or by rupture of capillaries). Proteolytic activity, mainly associated with lysosomes, and AChE activity, mostly membrane bound (but some soluble intracellularly, and also present in blood), would also be expected to increase in perfusates after severe tissue disruption.²⁴ However, increases in these markers produced by causes other than tissue lesions cannot be discarded *a priori*. TABLE 1 shows that high K⁺ concentrations stimulate the release of protein both in the globus pallidus and in the caudate putamen of the rat and, only in the caudate, the release of AChE activity. Depolarization-induced release of LDH or protease activities was not observed. In contrast, mechanical damage elicited an increased release of all four substances in the caudate and in the pallidum. It is worth noting that the mechanically induced release was always higher than that evoked by depolarization.

The results presented here indicate that LDH activity and, less conspicuously, protease activity can be used as reliable markers of tissue damage during push-pull perfusion. This is not so for protein and AChE activity: Greenfield *et al.*^{23,24} had already shown that protein and AChE activity are released after chemical depolarization from the substantia nigra and the caudate nucleus in the anesthetized cat. Our results confirm and extend these observations to the caudate-pallidal region in the freely moving rat. We have further explored the release of protein from the brain, since the constituents of this material are still unknown and will surely have neurobiological relevance. The chemical identity of these proteins has been confirmed by the fact that they can be detected in polyacrylamide gels through a silver stain (not shown), and can be measured both by the Lowry and the Bradford methods, which work on different principles (FIGURE 2). In addition, their release can be evoked by systemic administration of subconvulsant doses of metrazol (FIGURE 3), indicating that the protein release induced by K⁺ is not likely to be artifactual—i.e. due to K⁺ ionic strength. Moreover, this release is at least partially dependent on the presence of external Ca²⁺ (FIGURE 4). This observation is in contrast with that reported by Greenfield *et al.*—who did not use EGTA to chelate endogenous Ca²⁺²⁵—and suggests that part of this protein could be released through well known secretion mechanisms. Although the origin of these proteins released from the brain by chemical stimulation is not yet clear, preliminary experiments (Oksenberg *et al.*, in preparation) indicate that at least some of them can be synthesized from labeled precursors injected in the striatum. Thus, protein substances, first used as lesion markers, have become the subjects of neurobiological inquiries regarding their possible roles in neurochemical signaling.

The ability to detect damage occurring during *in vivo* perfusions is not enough for validating the use of a particular perfusion system; tests of the functionality of the preparation during perfusion are required to assess the value of these techniques. The ability of the tissue to release chemical transmitters can be used for this purpose. FIGURE 5 shows the resting and the stimulated *in vivo* release of [³H]GABA and endogenous enkephalins, the two transmitters known to be most abundant in the globus pallidus of the rat.^{27,28} As described in METHODS, after a washout period the release of tritiated GABA was evoked by high K⁺ concentrations in the perfusing medium, repeated stimulations releasing lower amounts of tracer (FIGURE 5, upper panel). This decrease can be related to the metabolism of [³H]GABA and its exhaustion in the tissue pools (see METHODS) and does not reflect progressive tissue change. This conclusion is supported by the observation that a stable evoked release of endogenous

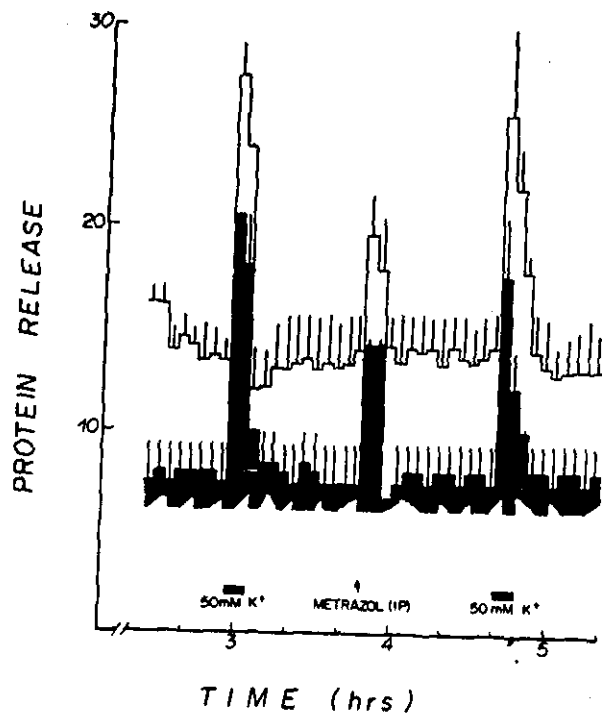


FIGURE 2. *In vivo* release of protein from rat brain as estimated by the methods of Lowry and Bradford. Animals were perfused in the globus pallidus using a flow rate of $50 \mu\text{l}/\text{min}$; fractions were collected at 4 min intervals (Treatments during perfusion are described in FIGURE 3). Protein content in perfusates was determined both by the methods of Lowry (\square) and Bradford (\blacksquare) and is expressed in $\mu\text{g}/\text{ml}$ (mean \pm interval, $N = 2$).

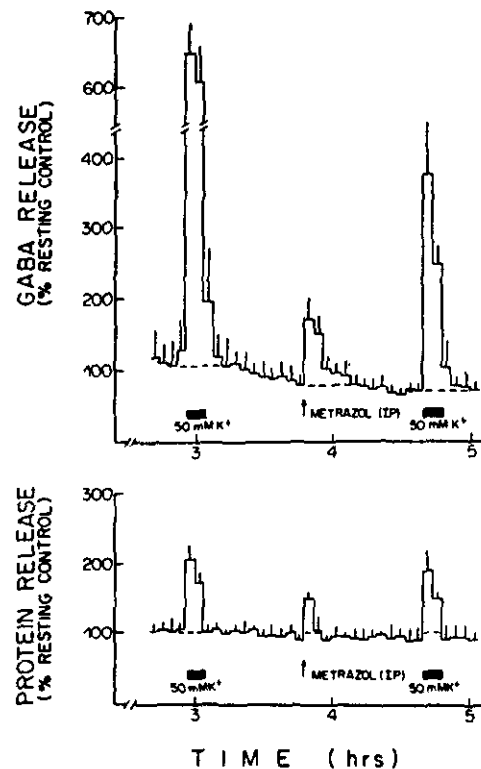


FIGURE 3. *In vivo* release of protein and GABA from rat brain after local or systemic stimulation. Perfusion was as described in FIGURE 2 except that the tissue was previously loaded with [^3H]GABA. Release was evoked by local perfusion with 50 mM K^+ (8 min) and by intraperitoneal metrazol ($40 \text{ mg}/\text{Kg}$). Release is expressed as % of the resting controls (mean \pm interval, $N = 2$).

design, we first analyzed the frequency of flow obstructions and vascular accidents observed during perfusions using these probes. TABLE 2 shows that with use of the modified slot model the bleeding episodes are reduced to those that occasionally, but almost unavoidably, occur after the acute insertion of the cannulae; flow obstructions are also seen less frequently when using the slot cannula. Surges of LDH and protein were always associated with insertions and flow obstructions.

However, no significant differences were seen in the basal levels of protein in perfusates obtained using either one of these probes, indicating that the sampling efficiency of the slot-cannula is comparable to that of the traditional model. In addition, the efficiency of both probes to deliver solutes into the perfused tissue was shown to be similar, since GABA uptake was about 30% using either cannula. The very low basal LDH activities in perfusates obtained with the Gaddum cannula are not significantly different from those obtained using the slot design. Also, the stimulated release and the resting release of GABA and enkephalin were similar with the Gaddum and the slot cannulae after 5 hr of perfusion. Thus, in spite of the marked differences in the frequency of accidental lesions observed using these two probes, they perform equally well at preserving the tissue viability. In summary, the slot cannula reduces the incidence of vascular accidents and flow occlusions occurring during perfusion, increasing the number of successful sessions when compared to the traditional design. These improvements allowed us to carry out long perfusion sessions needed for the studies of biological rhythms, which we present below.

*Release of Enkephalin during In Vivo Perfusion of the Globus Pallidus:
Relationship to GABA Releasing Systems and Diurnal Rhythms*

The search for a model system to study the neurobiology of the enkephalins in the central nervous system²⁰ has led researchers to the striatum, which has one of the highest enkephalin concentrations in the brain^{21,22} and is also one of the few macroscopic regions of the brain where the chemically related endorphin systems are not present.^{23,24} Additionally, within the striatum, enkephalin perikarya and fibers are segregated: the globus pallidus is rich in fibers and terminals, all cell bodies being found in the caudo-putamen nucleus.^{25,26} These advantages are exploited only in part when studying the release of enkephalin from the pallidum *in vitro*;¹¹ the use of an *in vivo* preparation to study the characteristics of enkephalin release takes advantage of the high density and anatomical segregation of enkephalin-containing terminals in the pallidum, while the integrity of pallidal connections with other brain regions is preserved. Previous studies demonstrated that endogenous immunoreactive enkephalin is released *in vivo* from the globus pallidus; this release is calcium dependent and is enhanced during local or caudate nucleus stimulation (see also FIGURE 5, lower panel.^{6,10,27}

In order to understand the physiological mechanisms regulating the *in vivo* release of enkephalin in this model system, we studied the effects of putative transmitters present in the pallidum on the release of enkephalins. Since the globus pallidus is one of the brain region's richest in glutamate decarboxylase,^{28,29} we investigated the relationship between the GABA-containing system and the release of enkephalin in this area.³⁰ These experiments revealed an enkephalin-releasing effect of the GABA receptor antagonist picrotoxin added *in situ*, suggesting that an endogenous GABA-ergic input tonically inhibits the release of enkephalin from the pallidum. Results from other laboratories supported this conclusion³¹ showing, however, that the enkephalin-GABA interactions in the striatum were more complex than this.

In the course of these investigations on the regulation of the *in vivo* release of enkephalin from the globus pallidus of the rat, we observed that this release was consistently higher in the late afternoon and evening than in the morning hours. Circadian rhythms and other periodic changes of the systems that produce or recognize endogenous opiates had already been documented.³²⁻³⁴ Some of the early failures to observe circadian changes in opiate peptides were due to very restricted sampling schedules.³⁵ Since many of these opiate rhythms had already been linked to physiological, endocrinological, or behavioral changes, the search for oscillations of opioid-mediated communication in a well-defined neural system promised to shed some light

TABLE 2. Comparison of the Performance of the Gaddum and the Slot Cannulae

	Gaddum Cannula	Slot Cannula
Bleeding episodes during perfusion*	4 in 6 perfusions (50% after cannula insertion)	1 in 6 perfusions (after cannula insertion)
Flow obstructions requiring cannula withdrawal*	5 in 6 perfusions	1 in 6 perfusions
LDH activity in perfusates in resting conditions*	1.5 ± 0.7	1.1 ± 0.6
Protein content in perfusates in resting conditions*	30 ± 12	35 ± 15
Enkephalin release*		
resting	15 ± 2	18 ± 4
K ⁺ -stimulated	29 ± 8	23 ± 3
[³ H]GABA uptake*	28 ± 5	29 ± 6
[³ H]GABA release*		
resting	0.13 ± 0.04	0.16 ± 0.04
K ⁺ -stimulated	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02

*Results from a series of twelve 6-hr perfusion sessions carried out in the pallidum of the rat in order to compare the Gaddum and slot cannulae. All bleeding episodes and severe flow obstructions are accompanied by increases in protein and LDH content in the corresponding perfusate fractions.

*LDH values are expressed in units/ml and protein in µg/ml; $\bar{X} \pm SEM$ ($N = 6$ perfusion sessions). Perfusate fractions collected during or after perfusion accidents were excluded from this calculation.

*Enkephalin values are expressed in units; $\bar{X} \pm SEM$ ($N = 6$). Enkephalin released as a consequence of stimulation is compared to that released during a resting control period.

*Perfusion of 3.5×10^6 cpm of tritiated GABA during 30 min was followed by a washout period until a stable release was reached. The GABA remaining in the tissue (uptake) is expressed as % of the [³H]GABA perfused. GABA release values are expressed as % of GABA in the tissue $\bar{X} \pm SEM$ ($N = 6$).

on their local functional role. Given the link previously established between the GABA and the enkephalin systems in the pallidum, we decided to study and compare possible diurnal variations in the *in vivo* release of these messengers in this region.³² The experimental protocols for *in vivo* perfusion were as those used in FIGURE 5. Six perfusion sessions were carried out from 8:00 a.m. to 2:30 p.m. (daytime perfusions) and six from 4:00 p.m. to 10:30 p.m. (evening perfusions). Resting enkephalin release increased 100% between 2:00 p.m. and 10:00 p.m., while [³H]GABA resting release decreased by 60% (FIGURE 6). The diurnal differences observed during resting release were more marked after stimulation: between day and evening perfusions the K⁺-

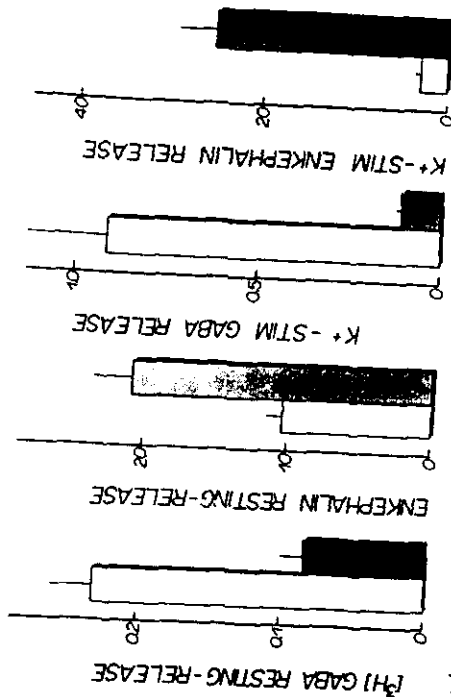


FIGURE 6. Release of endogenous enkephalin and $[^3\text{H}]\text{GABA}$ between daytime (\square) and evening (\blacksquare) hours. GABA resting-release decreased significantly ($P < .05$) between 2:00 p.m. and 10:00 p.m. The enkephalin release between these hours showed an opposite, statistically significant difference ($P < .05$). Resting GABA and enkephalin release are defined as indicated in FIGURE 5. Values are the average \pm SEM of six experiments. The K^+ -stimulated GABA release decreased 10-fold, while the enkephalin release increased sixfold between the morning and the evening hours. Values are expressed as the mean \pm SEM ($N = 8$).

stimulated enkephalin release increased sixfold while the K^+ -stimulated $[^3\text{H}]\text{GABA}$ release decreased more than tenfold (FIGURE 6). Possible artifactual causes for these changes in transmitter release were considered and precautions were taken to follow the same experimental procedures during morning and evening sessions. The steady decrease in $[^3\text{H}]\text{GABA}$ release observed during the course of a perfusion session (FIGURE 5) was considered when analyzing the perfusion data. Therefore, comparison of resting and stimulated GABA release between morning and evening perfusions was made using perfusate fractions obtained with the same delay after the infusion of $[^3\text{H}]\text{GABA}$. Also, it was found that the uptake of $[^3\text{H}]\text{GABA}$ and the fraction of radioactive tracer in the perfusates contributed by $[^3\text{H}]\text{GABA}$ were not different in the morning and evening sessions, and therefore do not account for the rhythm observed. Nevertheless, it must be noted that since the GABA we measured is exogenous, the anatomical structures and the mechanisms involved in its release may differ from those participating in the release of endogenous GABA.^{26,27,28}

The diurnal rhythm observed in the release of enkephalin from the nerve terminals in the pallidum is not due to changes in the pallidal or caudate enkephalin content. Wesche and Frederickson²⁹ reported that in heat-stressed mice, but not in normal controls, the enkephalin levels, specifically in the globus pallidus, increased from 7:30 a.m. to 3:30 p.m. In our experiments the levels of enkephalin in the globus pallidus and in the caudate ($5 \pm 1 \times 10^3$ units and $2 \pm 0.2 \times 10^3$ units, respectively) were not significantly different at 8 a.m., 2 p.m., or 10 p.m.

The diurnal rhythms in the release of enkephalin and GABA follow opposite patterns, suggesting the possibility of reciprocal controlling mechanisms. We have previously referred to the evidence for the existence of an inhibitory GABAergic mechanism upon the release of enkephalin from the pallidum, but no evidence is available for an influence of opiates on the GABA systems in this region. However, the complexity of the multiple opiate-GABA interactions in the striatum has already been documented. Moroni *et al.*^{25,26} have shown that an increased turnover of GABA is observed in the pallidum after the administration of opiates in the caudate. This effect appears to be due to an opiate-mediated inhibition of striatal GABAergic neurons, which in turn activate GABA neurons in the caudo-pallidal pathway. Clearly, the efforts to understand the mechanisms of the oscillation of GABA and enkephalin release in the pallidum have to go beyond the pallidal circuitry.

In relation to the functional role of these opposed diurnal rhythms of enkephalin and GABA release, it is noteworthy that their actions in the globus pallidus also have opposite effects on the motor activity of the rat: bilateral injection of enkephalin analogs in the pallidum leads to hyperactivity, an action blocked by naloxone.²⁷ In contrast, bilateral administration in the pallidum of drugs promoting GABAergic transmission produces akinesia and catalepsy, while the opposite is observed with drugs antagonizing this transmitter.^{28,29} Thus, an increased enkephalin release and a reduced GABA release at night in the pallidum would lead to hyperactivity. Since the rat is a nocturnal animal we suggest that the enkephalin-GABA transmission in the pallidum may be an important link in the neural control of the diurnal rhythms of motor activity in the rat.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. W. J. Shoemaker and Mrs. R. Azad-Fryer from the A. V. Davis Center of the Salk Institute for the preliminary tests of our anti-

enkephalin sera. Synthetic enkephalins were a generous gift from Dr. N. Ling. The technical assistance of Mrs. M. Sordo is gratefully recognized.

REFERENCES

- GADDUM, J. H. 1961. *J. Physiol. (Lond.)* 155: 1-2.
- MYERS, R. D. 1970. *Physiol. Behav.* 5: 243-246.
- NEQUILLON, A., A. CHERAMY & J. GLOWINSKI. 1977. *J. Neurochem.* 28: 819-828.
- ITHIMA, T. & K. NUNOKI. 1985. *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances.* A. Bayón & R. Drucker-Colin, Eds. Ch. 4. Academic Press, New York.
- PHILIPPU, A. 1985. *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive substances.* A. Bayón & R. Drucker-Colin, Eds. Ch. 13. Academic Press, New York.
- PHILIPPU, A., H. PRZUNTEK & W. ROENSBERG. 1973. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 276: 103-118.
- HAMBERGER, A., C-H. BERTHOLD, J. JACOBSON, B. KARLSSON, A. LEHMANN, B. NYSTROM & M. SANDBERG. 1985. *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances.* A. Bayón & R. Drucker-Colin, Eds. Ch. 8. Academic Press, New York.
- KONIG, J. F. R. & R. A. KLIPPEL. 1967. *The Rat Brain.* Krieger, Huntington, NY.
- BAYÓN, A., R. DRUCKER-COLÍN, L. LUOGO, W. J. SHOEMAKER, R. AZAD & F. E. BLOOM. 1981. *In: Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission.* R. Tapia & W. Cotman, Eds.: 29-41. Plenum Press, New York.
- BAYÓN, A., W. J. SHOEMAKER, L. LUOGO, R. AZAD, N. LING, R. DRUCKER-COLÍN & F. E. BLOOM. 1981. *Neurosci. Lett.* 24: 65-70.
- BAYÓN, A., J. ROSSIER, A. MAUSS, F. E. BLOOM, L. L. IVERSEN, N. LING & R. GUILLEMIN. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3503-3506.
- LOWRY O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL. 1951. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- BRADFORD, M. M. 1976. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BERGMAYER, H. U. 1974. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed. 2: 574-579. Academic Press, New York.
- ELLMAN, G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES & R. M. FEATHERSTONE. 1961. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- RINDERKNECHT, H., M. C. GEOKAS, P. SILVERMAN & D. J. HAVERBACK. 1968. *Clinica Chim. Acta* 21: 197-203.
- FRICKE, U. 1975. *Anal. Biochem.* 63: 555-558.
- SANDOVAL, M. E., C. A. TORNER & L. MEDRANO. 1984. *Neuroscience* 11: 867.
- ROSSIER, J., A. BAYÓN, T. M. VARGO, N. LING, R. GUILLEMIN & F. E. BLOOM. 1977. *Life Sci.* 21: 847-852.
- HONCHAR, M. P., B. K. HARTMAN & L. G. SHARPE. 1979. *Am. J. Physiol.* 236: R 45-56.
- YAKSH, T. L. & H. I. YAMAMURA. 1974. *J. Appl. Physiol.* 37: 428-434.
- HOEFTEN, R., G. HESSE & V. E. SHASHOUA. 1983. *J. Neurochem.* 40: 1448-1455.
- DRUCKER-COLIN, R. 1981. *In Psychopharmacology of Sleep.* D. Wheatley, Ed.: 53-72. Raven Press, New York.
- LAITHA, A. H. 1983. *Handbook of Neurochemistry*, 2nd ed. Enzymes in the nervous system. Vol. 4. Plenum Press, New York.
- GREENFIELD, S., A. CHERAMY, V. LEVIEL & J. GLOWINSKI. 1980. *Nature* 284: 355-357.
- GREENFIELD, S., A. CHERAMY & J. GLOWINSKI. 1983. *J. Neurochem.* 40: 1048-1057.
- GOTTFELD, Z. & D. M. JACOBOWITZ. 1978. *In Interactions Between Putative Neurotransmitters in the Brain.* S. Garattini, J. Pujol & R. Samanin, Eds.: 109-126. Raven Press, New York.
- YANG, H.-Y., J. S. HONG & E. COSTA. 1977. *Neuropharmacol.* 16: 303-307.
- KONDO, Y. & K. IWATSURU. 1978. *Brain Res.* 154: 395-400.
- HUGHES, J., T. W. SMITH, H. W. KOSTERLITZ, L. H. FOTHERGILL, B. A. MORGAN & H. MORRIS. 1975. *Nature (Lond.)* 255: 577-579.
- HÖKFELT, T., R. ELDE, O. JOHANSSON, L. TERENIUS & L. STEIN. 1977. *Neurosci. Lett.* 5: 25-31.
- BAYÓN, A., W. J. SHOEMAKER, F. E. BLOOM, A. MAUSS & R. GUILLEMIN. 1979. *Brain Res.* 179: 93-101.
- BAYÓN, A., L. KODA, E. BATTENBERG, R. AZAD, R. GUILLEMIN & F. E. BLOOM. 1980. *Neurosci. Lett.* 16: 75-80.
- BLOOM, F., E. BATTENBERG, J. ROSSIER, N. LING & R. GUILLEMIN. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1591-1595.
- BAYÓN, A., L. KODA, E. BATTENBERG & F. E. BLOOM. 1980. *Brain Res.* 183: 103-111.
- CUELLO, A. C. & S. G. FAXINGO. 1978. *Nature (Lond.)* 271: 178-180.
- CEBELLIN, F., P. SOURDIS, S. BOURGOIN, F. ARTAUD, T. D. REISINE, R. MICHELOT, J. GLOWINSKI & M. HAMON. 1981. *Neuroscience* 6: 301-313.
- RIKAK, C. E. 1981. *In GABA and the Basal Ganglia.* G. DiChiara & G. L. Gesa, Eds.: 23-36. Raven Press, New York.
- BAYÓN, A., R. DRUCKER-COLIN, L. LUOGO, W. J. SHOEMAKER, R. AZAD & F. E. BLOOM. 1981. *Soc. Neurosci. Abstr.* 7: 800.
- HERZ, A., T. DUKA, C. GRAMSCH, V. HÖLLT, H. OSBORNE, R. PRZEWOŁOCKI, R. SCHULTZ & M. WÜSTER. 1980. *In Neural Peptides and Neuronal Communication.* E. Costa & M. Trabucci, Eds.: 323-333. Raven Press, New York.
- BOUROOIN, S., F. CEBELLIN, F. ARTAUD, J. GLOWINSKI & M. HAMON. 1982. *Brain Res.* 248: 321-330.
- CAMPOS, A. E., M. LUJÁN, E. LÓPEZ, J. L. FIGUEROA-HERNÁNDEZ & R. RODRÍGUEZ. 1983. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 26: 101-103.
- FREDERICKSON, R. C. A., V. BURGIS & J. EDWARDS. 1977. *Science* 196: 756-758.
- KUMAR, M. S. A., C. L. CHEN & T. F. MUTHÉ. 1979. *Life Sci.* 25: 1687-1696.
- KUMAR, M. S. A., C. L. CHEN, D. C. SHARP, J. M. LIU, P. S. KALRA & S. R. KALRA. 1982. *Neuroendocrinology* 35: 28-31.
- NABER, D., R. M. COHEN, D. X. PICKER, W. H. KLINE, G. DAVIS, C. B. PERT & W. E. BUNNEY JR. 1981. *Life Sci.* 28: 931-935.
- PRZEWOŁOCKI, R., W. LASON, A. M. KONECKA, C. GRAMSCH, A. HERZ & L. D. REID. 1983. *Science* 219: 71-73.
- VON KNORRING, L., B. G. L. ALMAY, F. JOHANSSON, L. TERENIUS & A. WAHLSTROM. 1982. *Pain* 12: 265-272.
- WESCHE, D. L. & R. C. A. FREDERICKSON. 1981. *In Advances in Endogenous and Exogenous Opioids.* (Proc. Int. Narcotic Res. Conf.) Kodansha Ltd. Tokyo, pp. 232-234.
- CHILDERS, S. R. & S. H. SNYDER. 1979. *In Endorphins in Mental Health Research.* E. Usdin, W. E. Bunney & N. S. Kline, Eds.: 181-188. MacMillan Press, London.
- WESCHE, D. L. & R. C. A. FREDERICKSON. 1979. *Life Sci.* 24: 1861-1868.
- BAYÓN, A., B. ANTÓN & D. DÍAZ-PONTONES. 1983. *Soc. Neurosci. Abstr.* 9: 588.
- KEMEL, M. L., C. GAUCHI, J. GLOWINSKI & M. J. BESSON. 1979. *Life Sci.* 24: 2139-2150.
- VAN DER HEYDEN, J. A. M., K. VENEMA & J. KORF. 1980. *J. Neurochem.* 34: 1648-1653.
- MORONI, F., D. L. CHENEY, E. PERALTA & E. COSTA. 1978. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207: 870-877.
- MORONI, F., E. PERALTA, D. L. CHENEY & E. COSTA. 1979. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208: 190-194.
- JOYCE, E. M., G. F. KOOB, R. STRECKER, S. D. IVERSEN & F. E. BLOOM. 1981. *Brain Res.* 221: 359-370.
- PYCOCK, C., R. W. HORTON & C. D. MARSDEN. 1976. *Brain Res.* 116: 353-359.
- SCHIFFEL-KRÜGER, J., G. MAGELUND & M. C. OLIANAS. 1981. *In GABA and the Basal Ganglia.* G. DiChiara & G. L. Gesa, Eds.: 163-186. Raven Press, New York.

DISCUSION DE RESULTADOS

La técnica de perfusión intracerebral que utiliza cánulas concéntricas de infusión-extracción acopladas (push-pull) es la única que permite obtener información directa sobre la liberación *in vivo* de agentes neurotransmisores en el sistema nervioso central de mamíferos. La modificación realizada al diseño geométrico original de la cánula de perfusión descrita inicialmente por Gaddum (1961) y readaptada por Myers (1972) Cánula Gaddum-Myers) (figura 1, en texto de tesis), que consistió en la ranuración lateral realizada en el extremo terminal de la tubería de extracción (figura 4, en texto de tesis, y diagrama 2, en publicación Salud Mental) y en la apertura del sistema de extracción a la presión atmosférica, permitió mejorar e incrementar el contacto del líquido de perfusión con el área tisular perfundida, evitando así la presencia de presiones negativas en el sitio de perfusión que favorecen la generación de lesiones mecánicas severas que conllevan a la obliteración del sistema de extracción durante las sesiones de perfusión. Estos cambios físicos en el sistema de perfusión nos permitió obtener en forma exitosa sesiones continuas de perfusión, sin los fracasos experimentales que resultan de la manipulación del sistema de perfusión que utiliza la cánula Gaddum-Myers y el sistema de extracción cerrado a la presión atmosférica (Nieoullon y col., 1977; Bayón y col., 1985, 1986)

Bajo el principio funcional de nuestro sistema de perfusión, hemos explorado su utilidad en el estudio de la liberación de agentes neurotransmisores peptídicos (v.g., encefalinas) y no peptídicos (GABA) (Bayón, y col., 1981, 1985, 1987) de actividades enzimáticas (colinesterasas, proteasas, LDH) y material proteico (Bayón y col., 1986); que en conjunto fueron utilizados y ensayadas como indicadores bioquímicos de daño tisular y de la viabilidad del tejido bajo perfusión. El sistema de perfusión optimizado ha permitido coleccionar, evaluar y analizar no sólo el material biológico liberado mediante la estimulación química del tejido estriado (proteína, GABA, peptidos bioactivos), sino cuantificar, mediante procedimientos químicos de marcaje *in situ*, (^{35}S -Metionina), conjuntamente con la aplicación de métodos químicos semicuantitativos de precipitación con soluciones ácidas (ácido tricloroacético, TCA) y ensayos que permiten estimar el material proteico liberado a colecciones de perfusados (Método de Lowry y cuantificación de trazador en aparatos de líquido de centelleo); la liberación *in vivo* de material proteico sintetizado *de novo* en el estriado de la rata.

Nuestros resultados, apoyan fuertemente que la liberación inducida de este material de alto peso molecular, es altamente dependiente de la concentración de Ca^{++} extracelular [como se muestra en las gráficas representativas sobre la disminución de la liberación inducida de proteína con alto K^+ (50 mM) en presencia de EGTA en el medio de perfusión; ver sección de resultados en los artículos de publicación anexados) y del Ca^{++} intracelular (inhibición de la corriente entrante de Ca^{++} con Verapamil)]; donde la secreción de este material proteico sigue los mecanismos

fisiológicos y moleculares que regulan y favorecen la exocitosis de diversas moléculas mensajeras en el tejido neuronal y extraneuronal (v.g. cromograninas, DBH, AChE) como se ha expuesto, previamente.

Más aun, es importante hacer notar el efecto importante que tiene el Ca^{2+} en la regulación e inducción de la liberación de sustancias neuroactivas, en particular, el material proteico de origen neuronal. (Bayón, 1986; Greenfield, 1991; Biagoni y col., 1995).

La liberación de material proteico inducida por estimulación química despolarizante del tejido neuronal requiere del calcio extracelular para activar los mecanismos moleculares que intervienen en la fusión de vesículas y exocitosis del material soluble intravesicular (Levitt y col., 1993, Matthews, 1996) o la liberación de proteínas asociadas a membrana plasmática (Kaether y col., 1998).

Estudios recientes muestran que tanto el retículo endoplasmico como las mitocondrias localizadas en dendritas, soma y terminales sinápticas de las neuronas, tienen la capacidad no solo de almacenar y amortiguar incrementos significativos del ion Ca^{2+} en el espacio intracelular (similar al retículo sarcoplásmico de las células musculares), así como el de bombear y liberar al citoplasma el Ca^{2+} almacenado en estas pozas endógenas (Simpson y col., 1998), sino que además el ión liberado, es capaz de activar sistemas moleculares relevantes que intervienen en el denominado "fenómeno de acoplamiento estímulo-secreción" (Lledo y col., 1991).

Asimismo, diversos estudios *in vitro*, muestran que la despolarización neuronal con altas concentraciones del ion K^+ en presencia de bajas concentraciones de cafeína producen incrementos temporales sostenidos en la concentración intracelular Ca^{2+} de $[(Ca^{2+})_i]$, a diferencia de lo observado con la aplicación del ion en el medio de incubación (Simpson y col., 1998).

a).- Estos incrementos en la $[(Ca^{2+})_i]$, son resultantes de la extrusión vectorial del calcio almacenado en compartimentos subcelulares al espacio intracelular (EIC), inducidos por la activación de receptores-canales iónicos sensibles a IP_3 , (inositol trifosfato); al alcaloide vegetal rianodina, y/o a los propios incrementos de la $[(Ca^{2+})_i]$ (300 nM) (Simpson y col., 1998) (figura 7)

b).- Cuando las pozas de almacenamiento del $[(Ca^{2+})_i]$ se saturan, el K^+ es capaz de activar diversos sistemas de señalamiento intracelular, que promueven la movilización vectorial del calcio de sus pozas endógenas al citoplasma incrementando su concentración en el compartimento. Este efecto se ve retroalimentado por la misma liberación endógena del calcio que activa su propia liberación de sus pozas endógenas (Simpson y col., 1998).

c).- En tejidos neuroendocrinos, se ha mostrado que la despolarización membranar inducida por el ion K^+ , no provoca un incremento temporal en la $[(Ca^{2+})_i]$, como

ocurre a nivel neuronal, sino que este mecanismo facilita la movilización del calcio a sus pozas endógenas mediado a través de la activación de receptores sensibles a prostanglandinas (P_2) y ATP.

d).- Las oscilaciones observadas en la $[[Ca^{++}]_i]$, afectan el curso temporal de la excitabilidad neuronal ; esto es, a mayor liberación endógena de calcio, mayor es la respuesta obtenida y sostenida de los potenciales de acción dependientes de Ca^{++} , (cuantificados por técnicas electrofisiológicas) como se ha determinado por el efecto que produce algunos transmisores "de lenta acción" en la sinapsis (Slow-acting transmitters) (Simpson y col., 1998).

e).- Por consiguiente, la activación de los diferentes subtipos membranales de canales de Ca^{++} (L, N, P, Q, R) (Sitges, 1995, a y b) y la subsecuente permeabilidad de éste ión al EIC, induce un incremento significativo en su propia liberación de sus pozas endógenas (sensibles a IP_3 o al alcaloide vegetal ryanodina) (Simpson y col., 1998).

f).- Estas observaciones experimentales, apoyan y sustentan nuestros resultados obtenidos sobre la disminución de liberación de material proteico inducida mediante la perfusión de altas concentraciones del ion K^+ en presencia del agente farmacológico, EGTA (Bayón y col, 1986; Leff y Antón, 1999); así como la inhibición de la liberación del material por el antagonista de canales de Ca^{++} , Verapamil (Leff y Antón, 1999).

g).- Esto es, por un lado, la quelación del Ca^{++} extracelular mediada por EGTA (100 μM) produciría una baja movilización intracelular del catión de sus pozas endógenas al espacio submembranal, por lo que su baja concentración en el EIC, sería insuficiente para producir un incremento significativo en la liberación del material proteico endógeno cuando el tejido nervioso es estimulado químicamente mediante la perfusión local de soluciones despolarizantes que contienen 50 mM de K^+ (Bayón y col., 1986; Leff y Antón, 1999) como efecto de la disminución de los eventos que determinan la fusión y exocitosis del material proteico intravesicular (Livett, 1993).

h).- Asimismo, estos eventos se ven claramente exacerbados con la aplicación de Verapamil (50 μM), que al bloquear en forma irreversible la corriente entrante de Ca^{++} , (Sitges, 1990; Sitges y col., 1993; Sitges y Reyes, 1995) inhibe la activación de los mecanismos que facilitan la liberación y movilización endógena del catión. Por tanto estos eventos conllevan a la inhibición de la liberación del material reactivo a Lowry, durante la estimulación química despolarizante del tejido estriatal (Bayón y col., 1986; Leff y Antón, 1999).

i).- La liberación estriatal de moléculas de alto peso molecular, podría suscitarse partir de grupos neuronales ampliamente segregadas en el estriado de mamíferos como son las células espinosas de tamaño medio (30-50 μm) (Spiny I cells), consideradas por muchos autores como interneuronas clásicas del parénquima estriatal; por células neuronales grandes que extienden sus prolongaciones neuríticas a subnucleos

estriatales (SN, GP, NST). La co-localización de diversos mensajeros químicos de naturaleza peptídica y no peptídica, en adición con la expresión IHQ de AChE y DBH en estas células hace suponer que muchas otras sustancias neuroactivas podrían ser segregadas y secretadas por este subgrupo de neuronas, incluyendo material proteico y/o polipéptidos (Graybiel and Ragsdale, 1983)

j).- Esta serie de resultados, apoya el cuerpo de datos y observaciones experimentales previos sobre el origen neuronal exclusivo del material proteico liberado al EEC (Greenfield, 1991) y ponen en evidencia que el material proteico sintetizado *de novo* en el tejido estriatal requiere de un transporte axonal somatofugal a través de vesículas endocíticas o granulos de secreción, previo a su liberación presináptica en el globus pallidus o en el estriado (Bayón y col., 1986).

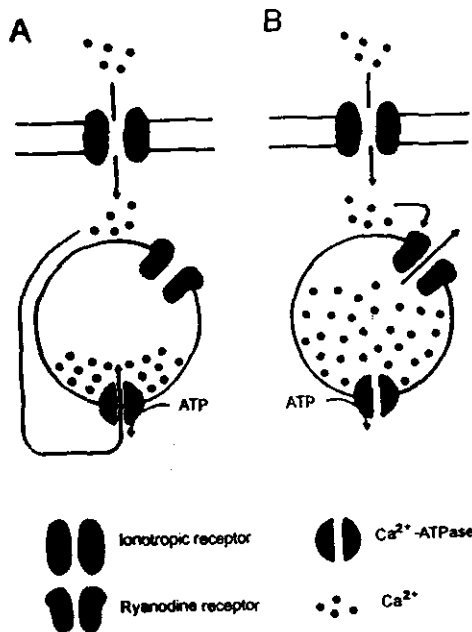
Podemos especular, que el material proteico liberado al espacio intersináptico podría representar una fuente biológica de nuevos mensajeros químicos, que aunados a la amplia gama de moléculas mensajeras descritas en el SNC de vertebrados e invertebrados; estos pudiesen conformar un nuevo grupo de moléculas mensajeras con funciones regulatorias o neuromodulatorias de la sinápsis una vez que su identificación, aislamiento, y caracterización molecular y funcional en un futuro cercano de éstas fuese posible. Esto permitiría entonces conocer, enmarcar y añadir posibles nuevas moléculas proteicas con propiedades funcionales similares a las previamente reportadas (v.g., AChE, Cromograninas, neurotrofinas, etc).

Figura 7.-

Efecto duál del Calcio externo durante su secuestro intracelular.

A).- El Ca^{2+} extracelular puede entrar a través de la activación de receptores ionotrópicos acoplados a canales de Ca^{2+} , y ser secuestrado en pozas de almacenamiento intracelular (retículo endoplásmico), supliendo las pozas depletadas del ion.

B).- Asimismo, la activación de otros receptores membranales puede inducir la liberación del ion de sus pozas intracelulares (Simpson y col., 1998).



CONCLUSIONES

1.- El empleo de la técnica de perfusión *in vivo* push-pull en combinación con procedimientos experimentales que facilitan la aplicación e incorporación de precursores metabólicos radioactivos permiten detectar y cuantificar cambios en la síntesis y liberación *in vivo* de material proteico total en el estriado de la rata.

2.- Esta metodología experimental no ha permitido identificar y cuantificar la liberación de material proteico inducida por despolarización química del tejido estriatal, cuya concentración alta en el espacio extracelular oscila en una concentración promedio del orden de los microgramos, lo que hace factible diseñar estrategias enfocadas a la identificación y caracterización molecular de nuevos componentes macromoleculares en el tejido nervioso.

3.- La gran abundancia del material proteico liberable por despolarización permite proponer la existencia de nuevas moléculas diferentes de los mensajeros peptidicos de baja masa molecular y cuya concentración en el espacio extracelular en el tejido nervioso oscila normalmente en ordenes de magnitud 1000-10,000 veces menor que la concentración estimada del material proteico en nuestros perfusados.

4.- La liberación inducida de material proteico total como el material proteico sintetizado *de novo* es dependiente de la presencia del calcio extracelular lo que hace factible proponer en apoyo al concepto de la liberación sinaptica de transmisores químicos en el sistema nervioso, el origen neuronal de una fracción importante del material proteico reactivo a Lowry liberable por despolarización química del tejido nervioso en nuestros experimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Acklin, C., Stoney, K., Rosenfeld, R.A., Miller, J.A., and Rhode, M.F. (1993). Recombinant human brain-derived neurotrophic factor (rHuBDNF). *Int. J. Peptide Prot. Res.*, 41:548-56.
- Almers, W. (1990). Exocytosis. *Ann. Rev. Physiol.*, 52: 607-24.
- Ann, K., Kowalchuk, J.A., Loyet, K.M., and Martin T.F. (1997). Novel Ca²⁺-binding protein (CAPS) related to UNC-31 required for Ca²⁺-activated exocytosis. *J.B.C.*, 272(33):19637-40.
- Anton., E.S., Weskamp, G., Narhi, L.O., Miller, J.A., Talvenheimo, J. (1994). Nerve growth factor and its low affinity receptor gene promote Schwann cell migration. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91:2795-99.
- Appletauer, G.S.L., and Korr, I.M. (1975). Axonal delivery of soluble, insoluble and electrophoretic fractions of neuronal proteins to muscles. *Exp. Neurol.*, 46:132-146.
- Appleyard, M.E., Vercher, J.L., Greenfield, S.A. (1988). Release of acetylcholinesterase from guinea pig cerebellum in vivo. *Neuroscience.*, 25: 133-138.
- Appleyard, M.E. (1992). Secreted acetylcholinesterase: non classical aspects of a classical enzyme. *Trends. Neurosci.*, 15: 485-490.
- Arias, B., Duran, R., Alfonso, D. In vivo release of dopamine and its metabolites from rat striatum in response to domoic acid. *Neurochem Res.*, 23(12):1509-14.
- Arenander, A.T., and De Vellis, J. (1980). Glial release proteins in cloned cultures and their modulation by hydrocortisone. *Brain Res.*, 200: 401-409.
- Arenander, A.T., and De Vellis, J. (1981a). Glial release proteins: Two dimensional electrophoretic identification of proteins regulated by hydrocortisone. *Brain Res.*, 224: 105-116.
- Arenander, A.T., and De Vellis, J. (1981b). Glial release proteins: Influences on neuronal morphological differentiation. *Brain Res.*, 224: 117-127.
- Arpagaus, M., Fedon, Y., Cousin, X., Chatonnet, A., Bergé, J.P., Fournier, D., Toutant, J.P. (1994). CDNA sequence, gene structure, and in vitro expression of Ace-1, gene

encoding of a class of acetylcholinesterase in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J.B.C.*, 269(3): 9957-65.

Attack, J.R., Perry, K.P., Bonham, J.R., and Perry, R.H. Molecular forms of acetylcholinesterase and butylcholinesterase in human plasma and cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.*, 48: 1845-50.

Aubert, I., Poirier, J., Gauthier, S., and Quirion, R. (1994). Multiple cholinergic markers are unexpectedly not altered in the rat dentate gyrus following entorhinal cortex lesions. *J. Neurosci.*, 14(5); 2476-84.

Averill, S., McMahon, S.B., Clary, D.o., Reinhardt, L.F., and Prestley, J.V.P. (1994). TrkA immunohistochemistry in adult dorsal root ganglia. *Eur.J. Neurosci.*, 7:148-94.

Avery, J., Hodel, A., and Whitaker, M. In vitro exocytosis in sea urchin eggs requires a synaptobrevin-related protein. *J.Cell Sci.*, 110 (Pt 14): 1555-61.

Bajjalieh, M.S., and Scheller, R.H. (1995). The biochemistry of neurotransmitter secretion. *J.B.C.*, 270(5): 1971-74.

Bailhache, T and Balthazart, J. (1993). The catecholaminergic system of the quail brain: immunohistochemical studies of dopamine beta -hydroxylase and tyrosine hydroxylase. *J. Comp. Neurol.*, 329(2): 230-56.

Balasubramanian, A.S., and Bhanumathy, C.D. (1993). Noncholinergic functions of cholinesterases. *FASEB. J.*, 7; 1354-58.

Banks, P., and Helles, K. (1965). The release of protein from the stimulated adrenal medula. *Biochem J.*, 97:40-41.

Baram, D., Linial, M., Mekori, Y.A., and Sagi-Eisenberg, R. (1998). Ca²⁺ dependent exocytosis in mast cells is stimulated by the Ca²⁺ sensor, synaptogamin 1. *J. Immunol.*, 161(10): 5120-23.

Barbacid, M. (1994). The trk family of neurotrophins receptors. *J. Neurobiol.*, 25:1386-403.

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

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

Barregi, S.R., and Giacobini, E. (1978). Acetylcholinesterase activity in ventricular and cisternal CSF of dogs: effects of chlorpromazine. *J. Neurosci. Res.*, 31: 335-339.

Bauerfiend, R., Jelinek, R., Hellwig, A, Huttner, W.B. (1995). Neurosecretory vesicles can be hybrids of synaptic vesicles and secretory granules. *Proctl.Natl. Acad. Sci. USA.*, 92(16):7342-6.

Bayón A., and Drucker-Colín, R.R. (1985). Methodological alternatives and experimental strategies for studying the in vivo perfusion and release of neuroactive substances in the central nervous system . in : *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances, Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colín, eds.), Academic Press, pp 1-7.

Bayón A., Antón B., Leff P., and Solano S.(1986). Release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides, enkephalins, from the striatum of the freely moving rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 473:401-417.

Bayón A., Shoemaker, W.j., Lugo, L., Azad, R., Ling, N., Drucker-Colín, R. and Bloom, F.E. (1981). In vivo release of enkephalin from the globus allidus. *Neurosci. Lett.* 24:65-70.

Bayón A., Solano S., Antón B., Castaño I and Diaz-Pontones., (1985). Push-pull perfusion studies on the in vivo release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides-enkephalins from the rat brain: In: *In vivo perfusion and release of neuroactive substances* (A.Bayón and R. Drucker colin, eds.). Academic Press, Orlando, Fla., pp.: 69-93.

Bayón, A. (1987). In vivo and in vitro studies on peptide release. In : *Neuromethods peptides* (Q.J. Pittman, G.B. Bajer and A.A. Boulton, eds.), Humana Press, New Jersey.

Bennett, M.R. (1998). Neurotransmitter release at individual sympathetic varicosities, boutons. *Adv Pharmacol.*, 42: 98-101.

Bennett, M.R., Gibson, W.G., and Robinson, J. (1997). Probabilistic secretion of quanta and the synaptosecretosome hypothesis: evoked release at active zones of varicosities, boutons and endplates. *Biophys. J.*, 73(4): 1815-29.

Benowitz , D.B., and Shashoua, V.E. (1979). Rapid labeled and secreted proteins of the chick brain. *J. Neurochem.*, 32:797-809.

Berger, B., and Alvarez, C. (1994). Neurochemical development of hippocampal region in the fetal rhesus monkey. II. Immunocytochemistry of peptides, calcium-binding

proteins, DARP-32, and monoamine innervation in the entorhinal cortex by the end of gestation. *Hippocampus*, 4(1):85-114.

Berninger, B., Garcia, D.E., Inagaki, N., Hahnel, C., Lindholm, H. (1993). BDNF and NT-3 induce intracellular Ca²⁺ elevation in hippocampal neurons. *Neuroreport*, 4: 1303-6.

Besleslin, D.B. and Myes, R. (1970). Technique for repeated superfusion or withdrawal of fluid from the exposed cerebral cortex of a conscious animal. *Physiol. Behav.* 5: 1173-75.

Biagoni, S., Bevilacqua, P., Scarsella, G., Vignoli, A.L., and Augusti-Toco, G. (1995). Characterization of acetylcholinesterase secretion in neuronal cultures and regulation by high K⁺ and soluble factors from target cells. *J. Neurochem.*, 64:1528-35.

Bianchi, L., Cilivicchi, M.A., Bolam, J.P., and De la Corte, L. (1998). The release of aminoacids from the rat neostriatum and substantia nigra in vivo: a dual microdialysis probe analyses. *Neuroscience*, 87(1): 171-80.

Billiard, J., Koh, D.S., Badcock, D.F., and Hille, B. (1997). Protein Kinase C as a signal for exocytosis. *Proctl. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(22):12192-7.

Bjorklund, A., Dunnett, S.B., Steveni, U., Lewis, M.E., and Iversen, S.D. (1980). Reinnervation of denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res.*, 199:307-333.

Black, M.M. and Lasek, R.J. (1977). The presence of transfer RNA in the axolemma of the squid giant axon. *J. Neurobiol.* 8: 229-237.

Blaschko, H., Comline, R.S., Schneider, F.H., Silver, M., and Smith, A.D. (1967). Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splachnic stimulation. *Nature*, 215, 48-49.

Bon, S., Bader, M.F., Aunis, D., Massoulié, J., Henry, J.P. (1990). Subcellular distribution of acetylcholinesterase forms in chromaffin cells.: Do chromaffin granules contain a specific secretory acetylcholinesterase. *Eur. J. Pharmacol.*, 190:221-232.

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

Brecknell, J.E., Du, J.S., Muir, E., Fidler, P.S., Havlin, M.L., Dunnett, S.B., and Fawcett, J.W. (1996). Bridge grafts of fibroblast growth factor-4-secreting

schwannoma cells promote functional axonal regeneration in the nigrostriatal pathway of the adult rat. *Neuroscience*, 74(3): 775-84.

Brimijoin, S. (1975). Stop-flow: A new technique for measuring axonal transport, and its application to the transport of dopamine-beta-hydroxylase. *J. Neuro..*, 6(4): 379-394.

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

Brimijoin, S., Balm, M., Hammond., Pammela, and Lennon, V.A. (1990). Selective complexing of acetylcholinesterase in brain by intravenously administered monoclonal antibody. *J. Neurochem.*, 54:236-241.

Broadwell, R.D., and Oliver, C. (1981). Golgi apparatus, GERL, and secretory granule formation within neurons of the hypothalamus-neurohypophysial system of control and hyperosmotically stressed mice. *J.B.C.*, 90:474-484.

Brown, H., Branstrom, R., Yang, S.N., Leibiger, I., Fried, G., Moede, T., Deeney, J.T., and Meister, B. (1998). Cystein string ring (CSP) is an insulin secretory granule-associated protein regulating beta-cell exocytosis. *EMBO J.*, 17(17): 5048-58.

Burgoyne, R.D. (1990). Secretory vesicle-associated proteins and their role in exocytosis. *Ann. Rev. Physiol.*, 52: 647-59.

Burgoyne, R.D., and Morgan, A. (1998). Analysis of regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells : insights into NSF/SNAP/SNARE function. *Bioessays.*, 20(4):328-35.

Burguess, t. and Kelly, R.B. (1987). *Constitutive and regulated secretion of proteins.* Annu Rev. Cell. Biol., 3: 243-293.

Butcher, L.L., and Woolf, N.J. (1982). Monoaminergic-cholinergic relationship in the chemical communication matrix of the substantia nigrae and neostriatum. *Brain Res. Bull.*, 9: 475.

Cabelli, R.J., Hohn, A., Shatz, C.J. (1995). Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT4/5 or BDNF. *Science*, 267:1662-66.

Cannaff, L., Bevan, S., Wheeler, D.G., Moulant, A.J., Rehfuss, R.P., White, J.H., and Hendy, G.N. (1998). Analysis of molecular mechanisms controlling neuroendocrine cell specific transcription of the chromogonin A gene. *Endocrinol.*, 139(3): 1184-96.

Cardenas, H., and Ramirez, V.D. (1996). Maintenance of hypothalamic GnRH release during lactation in the rat: a push-pull perfusion study. *Biol. Res.* 29(2):259-65.

Carr, L.A. and Moore, K.E. (1969). Norepinephrine: release from brain by d-amphetamine in vivo. *Science* 164: 322-323.

Carter, B., Zirrgiebel, U., and Barde Y-A. (1995). Differential regulation of p21-ras activation in neurons by the nerve growth factor and brain derived growth factor. *J.B.C.*, 270:21751-57.

Castle, D.J., Cameron, R., Arvan, P., von Zastrow, M., and Rudnick, g. (1989). Similarities and differences among neuroendocrine, exocrine and endocytic vesicles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 448-462.

Clegg, R.A., Gardner, R.A., Lavielle, F., Boisgard, R., Ollivier-Bousquet, M. (1998). Casein secretion in mammary tissue: tonic regulation of basal secretion by protein kinase A. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 141(1-2):163-77.

Cohen-Corey, S., Fraser, S.E., (1994). BDNF in the development of the visual system of Kenopus. *Neuron*, 12:747-61.

Cohn, D.V. Fasciotto, B.H., Reese, B.K., and Zhang, J.X. (1995). Chromogranin A: A novel regulator of parathyroid gland secretion. *J. Nutr.*, 125: 201S-209S.

Crook, D.K., and Pow, D.V.(1997). Analysis of the distribution of glycine and GABA in amacrine cells of the developing rabbit retina: a comparison with the ontogeny of a functional GABA transport system in the retinal neurons. *Vis Neurosci.*, 14(4):751-763.

Chaudry, F.A., Reimer, R.J., Bellochio, E.E., Dandolt, N:C., Osen, K.K., Edwards, R:H., and Strom-Mathisen, J. (1998). The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J. Neurosci.* 18(23): 9733-50.

Checler, F., and Vincent, J.P. (1989). Peptidasic activities associated with acetylcholinesterase are due to contaminating enzymes. *J. Neurochem.*, 53: 924-928.

Choi, R.C., Yung, L.Y., Wan, D.C., Dong, T.T., Wong, Y.H., and Tsim, K.W. (1998). The calcitonin gene-related peptide- induced acetylcholinesterase synthesis in cultured chick myotubes is mediated by cyclic AMP. *J. Neuroch.*, 71(1): 152-60.

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

Chubb, I.W. , and Smith, A.D. (1975^a). Release of acetylcholinesterase into the perfusate from the ox adrenal gland. *Proc. R. Soc. Lond.*, 191: 263-269.

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

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

Darvesh, S., Grantham, D.L., and Hopkins, D.A. (1998). Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.*, 393(3): 374-90.

Davies, A.M. (1994). The role of neurotrophins in the developing nervous system. *J. Neurobiol.*, 25:1334-48.

Davies, A.M., Horton, A., Burton, L.E., Schmelzer, C. and Vandlen, R.(1993). Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific survival factor for distinct populations of sensory neurons. *Neuron.*, 11: 565-74.

Davletov, B.A., Meunier, F.A., Ashton, A.C., Matsushita, H., Hirst, W.D., Lelianova, V.G., Wilkin, G.P., Dolly, J.o., and Ushkariov, Y.A. (1998). Vesicle exocytosis stimulated bu alpha-latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored Ca²⁺. *EMBO J.*, 17(4): 3909-20.

Davson, H. (1970). *Physiology of the cerebrospinal fluid*. J.A. Churchill, London, editor.

De Bello, W.M., O'Connor, V., Dresbach,T., Whiteheart, S.W., Wang, S.H., Schweltzer, F., Betz, H., Rothman, J.E., and Augustine, G,J. (1995). SNAP-mediated protein-protein interactions essential for neurotransmitter release. *Nature*, 373:626-30.

De Camilli, P., and Reinhard, J. (1990). Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Ann. Rev. Physiol.* , 52: 625-45.

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

De Potter, W.P., Smith, A.D., and De Schaepdryver, A.F. (1970). Subcellular fractionation of the splenic nerve: ATP, cromogranin A and dopamine-beta-hydroxylase in noradrenergic vesicles. *Tissue and Cell.*, 2:529-546.

Del Arco, A., Castaneda T.R., and Mora, F. (1998) Amphetamine releases GABA in striatum of the freely moving rat: involvement of calcium and high transporter mechanisms. *Neuropharmacol.*, 37(2): 199-205.

Delgado, J.M.R.(1970). Telecommunication in brain research. In "Telemetric methods in pharmacology" (Proc. 4th. Congr.; Pharmacol; Basel, Schwabe and Co., eds), pp.270-278.

Delgado, J.M.R., Lerma, J., Martin del Rio, R., and Solis, J.M. (1985). Use of dialytrodes in brain neurochemistry. In: In vivo perfusion and release of neuroactive substances (A.Bayón and R. Drucker colín, eds.). Academic Press, Orlando, Fla., pp.: 95-117.

Dietl, H., and Philippu, A. (1979). In vivo release of endogenous GABA in the cat hypothalamus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 308: 143-147.

Djamgoz, M.B.A., Stell, W.K., Chin, C.A., and Lamm, D.M. (1981). An opiate system in the goldfish retina. *Nature.*, 292: 620-23.

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

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

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

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

Duffy, C., Teyler,T.J., and Shashoua,V.E. (1981). Long term potentiation in hippocampal slice: evidence for stimulated secretion of newly synthesizedproteins. *Science*, 212:1184-1151.

Edstrom, A., (1966). Aminoacid incorporation in isolated Mauthner nerve fibre components. *J. Neurochem.*, 13: 1507-14.

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

Elder, U., Kirschmair, R, Pohl, P., Jobst, K.A., Smith, A.D. , Mally, J., Riederer, P., Reichmann, H., and Winkler, H. (1998). Levels and proteolytic processing of chromogranin A and B and secretogranin II in cerebrospinal fluid in neurological diseases. *J. Neural. Transm.*, 105(1):39-51.

Enfors, P., Van den Water, T., Loring, T., and Jaenisch, R. (1995). Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron*, 14: 1153-64.

Engel, A.K., Kretzberg, G.W. (1986). Changes of acetylcholinesterase molecular forms in regenerating motor neurons. *Neuroscience*, 18(2): 467-473.

English, K.L., Chernevskaya, N.I., and Nowicky, M.C. (1997). Short-term changes in the Ca²⁺-exocytosis relationship during repetitive pulse protocols in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.*, 17(23): 9010-25.

Facquhar, M.G. (1971). Processing of secretory products by cells of the anterior pituitary gland. In: *Subcellular structure and function in endocrine organs.* (H.Heller and K.Lederis, eds.). Elsevier, North holland Publishing, Co., pp.: 462-482.

Facquhar, M.G., and Palade, G.E. (1981). The golgi apparatus (complex): from the artifact to centerstage. *J.B.C.*, 91 (No. 3, Pt-2):77s-103s.

Fadic, R., and Inestrosa N.C. (1989). Nerve regulation of class I and class II- asymmetric forms of acetylcholinesterase in rat skeletal muscle. *J. Neurosci.*, 22: 449-455.

Fagg, G.E., and Foster, A.C. (1983). Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience.*, 9:701-719.

Feldberg, W. And Myers, R.D. (1966). Hypothermia produced by chloralose acting on the hypothalamus. *J. Physiol.* 179: 509-517.

Fischer-Colbrie, R., Hagan, C., and Schober, M. (1989). Chromogranins A,B, and C: Widespread constituents of secretory vesicles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 120-133.

Fischer-Colbrie, R., Laslop, A., and Kirschmair, R. (1995). Secretogranin II: Molecular properties, regulation of biosynthesis and processing to the neuropeptide secretoneurin. *Prog. in Neurobiol.*, 46: 49-70.

Fox, R. and Hilton, S. (1958) Bradykinin formation in human skin as a factor in heat vasodilatation. *J. Physiol.* 142: 219-232.

Franklin, J.L., and Johnson, E.M. (1998). Control coupling in neuronal size homeostasis by trophic factor-mediated coupling of protein degradation to protein synthesis. *J.B.C.*, 142(5): 1313-24.

Friedel, T., Orchard, I., and Loughton, B.G. (1981). Release of neurosecretory protein from insect neurohemal tissue following electrical stimulation. *Brain Res.*, 208: 451-55.

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

Fuentes, M.E., Rosenberry, T.L., and Inestrosa N.C. (1988). A 13kDa fragment is responsible for the hydrophobic aggregation of brain G4 acetylcholinesterase. *Biochem. J.*, 256: 1047-50.

Gaddum, J.H. (1961) Push-pull cannulae. *J. Physiol.* 155: 1-2.

Gasman, S, Chasserot-Golaz, S., Popoff, M.R., Aunis, D., Bader, M.F. (1997). Trimeric G proteins control exocytosis in chromaffin cells. Go regulates the peripheral actin network and catecholamine secretion by a mechanism involving the small GTP-binding protein Rho. *J.B.C.*, 272(33): 20564-71.

Gaybriel, A.M., and Ragsdale, C. W. Jr. (1983). Biochemical Anatomy of the Striatum; In: *Chemical Neuroanatomy*, Emson P:C. edit., pp.: 427-504.

Geffen, L, livett, B.G., and Rush, L. (1970). Immunohistochemical localization of chromogranins in sheep sympathetic neurons and their release by nerve impulses. In: *New aspects of storage and release mechanisms of catecholamines* (H.G. Kronenberg and H.J. Schuman, eds.) Spring Verlag, New York; pp.: 58-72.

Geula, C., Mesulam, M.M., Tokuno, H., and Chin Kuo, C. (1993). Developmentally transient expression of acetylcholinesterase within cortical pyramidal neurons of the rat brain. *Develop. Brain Res.*, 76: 23-31.

Globus, A., Lux., H.D., and Schubert, P. (1968).. Somatodendritic spread of intracellularly injected tritiated glycine in cat spinal motoneurons. *Brain Res.*, 11: 440-445.

Golstein, R.S., Weiss, R.R. and Schwartz, J.H. (1982). Intraneuronal injection of horseradish peroxidase label glial cell associated with the axon of the giant metacerebral neurons of *Aplysia*. *J. Neurosci.*, 2: 1567-77.

Goodall, A.R., Danks, K., Walker, J.H., Ball, S.G., and Vaughan, P.F. (1997). Occurrence of two types of secretory vesicles in the human neuroblastoma SH-SY5Y. *J. Neurochem.*, 68(4): 1542-52.

Götz, R., Köster, R., Winkler, C., Raulf, F., and Lottspeich, F. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of nerve growth factor family. *Nature*, 372: 266-69.

Gou, Z., Turner, C., Castle, D. (1998). Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellopodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell*, 94(4): 537-48.

Grafstein, B. (1971). Transneuronal transfer of radioactivity in the central nervous system. *Science*, 172:177-79.

Grafstein, B., and Laurenco, R. (1973). Transport of radioactivity from eye to visual cortex in the mouse. *Exp. Neurol.*, 39: 44-57. in the central nervous system. *Science*, 172:177-79.

Gratzl, M., Keieger-Brauer, H., Ekerdt, R. (1981). Latent Acetylcholinesterase in secretory vesicles isolated from adrenal medulla. *Biochica et Biophysica Acta.*, 549: 355-366.

Greenfield, S.A. (1991). A noncholinergic function of acetylcholinesterase in the brain: From neuronal secretion to generation of movement. *Cel. And Mol. Neurobiol.*, 11(1):55-77.

Greenfield, S.A. (1984^a). Enzymes as nigrostriatal modulators. In : the Basal Ganglia. *Adv. Behav. Biol.* (J.S., McKenzie., R.E. Kemm, and L.M. Wilcock, eds.). Plenum Press, New York, Vol., 27: 319-322.

Greenfield, S.A., and Shaw, S.G. (1982). Release of acetylcholinesterase and aminopeptidase in vivo following infusion of amphetamine into the substantia nigra. *Neuroscience*, 7: 2883-93.

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

Greenfield, S.A., Cheramy, A., and Glowinski, J. (1983a). Evoked release of proteins from central neurons in vivo. *J. Neurochem.* 40: 1048-57.

Greenfield, S.A., Cheramy, A., Leviel, V., and Glowinski, J. (1980). In vivo release of acetylcholinesterase in the cat substantia nigrae and caudate nuclei. *Nature*, 284: 355.

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

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

Greenfield, S.A., Chubb, I.W., Grunewald, R.A., Henderson, Z., May, J., Portney, S., Weston, J., and Wright, H.C. (1984). A noncholinergic function of acetylcholinesterase in the substantia nigra: behavioral evidence. *Exp. Br. Res.*, 54:39: 83-88.

Greenfield, S.A., Grunwald, R.A., Foley, P., and Shaw, S.G. (1983b). Origin of various enzymes released from the substantia nigra and caudate nucleus: effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nigro-striatal pathway. *J. Comp. Neurol.*, 214: 87.

Greenfield, S.A., Stein, J.F., Hodgson, A.J., and Chubb, I.W., (1981). Depression of nigral pars compacta cell discharge by exogenous acetylcholinesterase. *Neuroscience*, 6:2287-95.

Hagg, T and Varon, S. (1993). CNTF prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA.* , 90(13): 6315-19.

Hall, C.W., Behbehani, N.M. (1998). Synaptic effects of nitric oxide on enkephalinergic, GABAergic, and glutamatergic networks of rat periaqueductal gray. *Brain Res.*, 805 (1-2): 69-87.

Hallböök, F., Ibañez, C.F., Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron*, 6:845-58.

Hamberger, A., Berthold, C.H., Jacobson, I., Karlsson B., Lehmann A., Nyström, B. and Sandberg, M. (1985). In vivo brain dialysis of extracellular non transmitter and putative transmitter aminoacids. In : *In Vivo perfusion and release of neuroactive substances. Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colin, eds.), Academic Press, New York., pp. 119-139.

Hammerschlag, R., Stone, G.C., Bolen F.C., Lindsey, J.D. and Ellisman , M. (1982). Evidence that all newly synthesized proteins destined for fast axonal transport pass through the golgi apparatus. *J.B.C.*, 93: 568-572.

Henderson, C.E., Phillips, H.S., Pollock, R.A., Davies, A.M., and Lemeleu, C. (1994). GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science.*, 266:1062-64.

Hendrickson, A.E. (1972). Electron microscopic distribution of axoplasmic transport. *J. Comp. Neurol.*, 144: 381-388.

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

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

Heydorn, W.E., Nguyen, K.Q., Creed, G., and Jacobowitz, D.M. (1985). Effect of reduction cholinergic input on the concentration of specific proteins in different cortical regions of the rat brain. *Brain Res.*, 320: 209-218.

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

Hofer, M., and Barde, Y-A. (1988). Brain derived neurotrophic factors prevents neuronal death in vivo. *Nature*, 331:261-62.

Hohne-Zell, B., Galler, A., Schepp, W., Gratzl, M., and Prinz, C. (1997). Functional importance of synaptobrevin and SNAP-25 during exocytosis of histamine by rat gastric enterochromaffin-like-cells. *Endocrinol.*, 138(12):5518-26.

Holz, R.W., Brondyk, W.K., Senter, R.A., Kuizon, L., and Macara, I.G. (1994). Evidence for the involvement of a Rab 3^a in Ca²⁺-dependent exocytosis from adranal chromaffin cells. *J.B.C.*, 269(14):10229-234.

Hory-Lee, F., Russell, M., Lindsay, R.M., and Frank, M. (1993). Neurotrophin 3 supports the survival of developing muscle sensory neurons in culture. *Proctl.Natl. Acad. Sci. USA.*, 90:2613-17.

Huang X., Wheeler, M.B., Kang, Y.H., Sheu, L., Luckaks, G.L., Trimble, W.S., and Gaisano, H.Y. (1998). Truncated SNAP-25 (1-197) like botulinum neurotoxin A, can inhibit insulin secretion from HIT-T15 insulinoma cells. *Mol. Endocrinol.*, 12(7):1060-70.

Iijima, T. and Nunoki, K. (1985). Superfusion and electrical stimulation of the canine brain with a push-pull cannulae. In : *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances, Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colin, eds.), Academic Press, Orlando, Fla. pp. 249-270

Ikarachi, Y., Yuzurihara, M., Takahashi, A., Ishimaru, H., Shiobara, T., and Maruyama, Y. (1998) Direct regulation of acetylcholine release by N-methyl-D-aspartic acid receptors in rat striatum. *Brain Res.*, 795(1-2):215-20.

Inestrosa N.C., and Perelman A. (1989). Distribution and anchoring of molecular forms of acetylcholinesterase. *Trends. Pharmacol.*, 10: 325-329.

Jena, B.P., Gumkowski, F.D., Konieczko, E.M., Fischer von Mollard, G., Reinhard, J., and Jamieson, J.D. (1994). Redistribution of a Rab 3 like-GTP- binding protein from secretory granules to the Golgi complex in pancreatic acinar cells during regulated exocytosis. *J.B.C.*, 124(1-2): 43-53.

Jones, S.A., Holmes, C., Budd, T.C., and Greenfield, S.A. (1995). The effect of acetylcholinesterase on outgrowth of dopaminergic neurons in organotypic slice culture of rat midbrain. *Cel. Tissue. Res.*, 279: 323-330.

Jungbluth, S., Bailey, K., Barde Y.A. (1994). Purification and characterization of a brain derived neurotrophic factor/neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer. *Eur.J. Biochem.*, 221:571-84.

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

Kaether, C., Salm, T., Glombik, M., Almers, W., Gerdes, H.H. (1998). Targeting of green fluorescent protein to neuroendocrine secretory granules : a new tool for real time studies of regulated protein secretion. *J.B.C.*, 230: 1525-32

Kang, H.J., and Schuman, E.M. (1995). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*, 267: 1404-17.

Kaplan, D.R., and Stephens, R.M. (1994). Neurotrophin signal transduction by the trk receptor. *J. Neurobiol.*, 25:1658-62.

Karpel, R., Ben Aziz-Ayola, R., Sternfield, M., Ehrlich, G., Ginzberg, D., Tarroni, P., Clementi, F., Zakut, H., and Soreq, H. (1994). Expression of three alternative acetylcholinesterase messengers RNAs in human tumor cell lines of different tissue origins. *Exp. Cell. Res.*, 210: 268-277.

Kasa, P. (1968). Acetylcholinesterase transport in the central and peripheral nervous tissue: the role of tubules in the enzyme transport. *Nature*, 218: 1265-67.

Kikuchi, T., Wang, Y., Sato, K., and Okumura, F. (1998). In vivo effects of propofol on acetylcholine release from the frontal cortex, hippocampus and striatum studied by intracerebral microdialysis in freely moving rats. *Br J. Anaesth.*, 80(5):644-8.

Kirschmair R., Hogue-Angeletti, R., Gutierrez, J., Fischer-Colbrie, R., and Winkler, H. (1993). Secretoneurin- a neuropeptide generated in brain, adrenal medulla and other neuroendocrine tissue by proteolytic processing of secretogranin II (chromogranin C). *Neuroscience*, 53: 359-365.

Kirschmair, r., Lettner, B., Fischer-Colbrie, R., Marksteiner, J., Hogue-Angueletti, R., and Winkler, H. (1995). Large variations in the proteolytic formation of chromogranin A-derived peptide (GE-25) in neuroendocrine tissues. *Biochem. J.*, 310:331-336.

Kischner, N., Sage, J.J., and Smith, W.J. (1967). Mechanism of secretion from the adrenal medulla.: Release of catecholamines and storage vesicle secretion of protein in response to chemical stimulation. *Mol. Pharmacol.*, 3: 254-265.

Kirschner, N. (1962). *J.B.C.*, 237:2311-17.

Kish, P.E., Fisher-Bovenkerk, C., and Tetsufumi, U. (1989). Active transport of gamma-aminobutyric acid and glycine into synaptic vesicles. *P:N:A:S: USA.*, 86 : 3877-81.

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

Koelle, G.B. (1988). Enhancement of acetylcholinesterase synthesis by glycyl-L-glutamine: an example of a small peptide that regulates differential transcription ?. *Trends. Pharmacol.*, 9: 318-321.

Koenig, E. (1985). Local synthesis of axonal transport. In : *Monoblock of Neurochemistry. 2nd. Edition.*, Plenum Press, N.Y. and Lond., 7: 315-339.

Koizumi, S., and Inoue, K. (1998). Functional coupling of secretion and capacitative calcium entry in PC12 cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 247(2): 293-8.

Kondo, Y., and Iwatsubo, K.J. (1978). Increased released of preloaded ³H-GABA from substantia nigra in vivo following stimulation of caudate nucleus and globus pallidus. *Brain Res.* , 154: 395-400.

Konya, H., Masuda, H., Itoh, K., Kakishita, E., and Matsuoka, A. (1998) Modification of dopamine release by nociceptin in conscious rat striatum. *Brain Res.*, 788(1-2):341-4.

Korr, I.M., Wilkinson, P.N., and Chornok, F.W. (1967). Axonal delivery of neuroplasmic components to muscle cells. *Science*, 155:342-345.

Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brenn, G., Thoenen, H. (1995). Hippocampal long term potentiation is impaired in mice lacking BDNF. *Proctl. Natl. Acad. Sci. USA.*, 192: 8856-60.

Koshkulovala, S., Finn, T.P., Nishi, R., and Halvorsen, S.W. (1996). Identification of functiona receptors for ciliary neurotrophic factor on ciliary ganglion neurons. *Neuroscience*, 72(3):821-32.

Kovacs, D.A., Zoll, J.G., and Erickson, C.K. (1976). Improved intracerebral chemitrode for chemical and electrical studies of the brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4: 621-625.

Kreutzberg, G.W., and Kaiya, H. (1974). Exogenous acetylcholinesterase as a tracer for extracellular pathways in the brain. *Histochemie.*, 42:233-237.

Kreutzberg, G.W., and Toth, L. (1974). Dendritic secretion : a way for neuron to communicate with the vasculature. *Naturwissenschaften*, 61:37.

Kristensson, K., Olsson, V., and Sjostrand, J. (1971). Axonal uptake and retrograde transport of exogenous proteins in the hypoglossal nerve. *Histochemie.*, 42: 233-237.

Kroesen, S., Marksteiner, J., Leitner, B., Hogue-Anguelett, R., Fischer-Colbrie, R., and Winkler, H. (1996). Rat brain: distribution of immunoreactivity of PE-11, a peptide derived from chromogranin B. *Eur. J. Neurosci.*, 8(12): 2679-89.

Landgraf, R. (1996) Release of vasopressin from supraoptic neurons within the median eminence *in vivo*. A combined microdialysis and push-pull perfusion study in the rat. *Brain Res.* 726(1-2): 237-41.

Landwehrmeyer, B., Probst, A., Palacios, J.M., and Mengod, G. (1993). Expression of acetylcholinesterase messenger RNA in human brain: an *in situ* hybridization study. *Neuroscience*, 57(3): 615-634.

Lang, J., Fukuda, M., Zhang, H., Mikoshiba, K., Wollheim, C.B (1997). The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium. *EMBO J.*, 16(7): 5837-46.

Lars-Inge, L., Nielsen, J.H., Hutton, J.C., Madsen, O.D. (1989). Pancreatic hormones are expressed on the surface of human and rat islet cells through exocytic sites. *Eur. J. Cell Biol.*, 48, 45-51.

Lasek, R.J. (1970). Protein transport in neurons. *Int. Rev. Neurobiol.*, 13:289-324.

Lasek, R.J., Gainer, H., Barker, J.L. (1977). Cell to cell transfer of glial proteins to the squid giant axon. *J.B.C.*, 74: 501-527.

Layer, P.G., Alber, R., and Sporns, O. (1987). Quantitative development and molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase during morphogenesis and synaptogenesis of the chick brain and retina. *J. Neurochem.*, 49:175-182.

Leff P. y Antón B. (1999). Síntesis y liberación *in vivo* de proteínas en el sistema nervioso central de la rata. *Salud Mental*. Vol. 22 (1) : 35-45.

Lehman, J., and Fibigier, H.C. (1978). Acetylcholinesterase in the substantia nigra and caudate-putamen: properties and localization in dopamine neurons. *J. Neurochem.*, 30: 615.

Levi-Montalcini, R., Brooker, B. (1960). Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve growth factor protein. *Proctl. Natl. Acad. Sci. USA.*, 46:384-91.

Leviel, V., Cheramy, A., and Glowinski, J. (1979). Role of dendritic release of dopamine in the reciprocal control of the two nigro-striatal dopaminergic pathways. *Nature* 280: 236.

Levitt, B.G.(1993). Chromaffin cells: roles for vesicle proteins and Ca²⁺ in hormone secretion and exocytosis. *Trends. In Pharmacol.*, 14: 346-348.

Lewin, G.R., and Barde, Y-A. (1996). Physiology of neurotrophins. *Ann Rev. Neurosci.*, 19: 289-317.

Lewis, H.S., and Prescott, D.J. (1982). Aggregation properties of the Acetylcholinesterase from the central nervous system of *Manduca sexta*. *J. Neurochem.*, 38:1709-18.

Li, Y., Camp, S., Rachinsky, T.L., Mufson, E.J., Mesulam, M.M. (1991). Gene structure of mammalian acetylcholinesterase: Alternative exons dictate tissue specific expression. *J.B.C.*, 266(23):83-90.

Liesli, P., Panuala, P., and Rechartd, L. (1980). Ultrastructural localization of acetylcholinesterase activity in primary cultures of rat substantia nigra. *Histochemistry*, 70:7-18.

Linial, M., Ilouz, N., and Parnaz, H. (1997). Voltage-dependent interaction between the muscarinic ACh receptor and proteins of the exocytotic machinery. *J.Physiol. (Lond).*, 504(Pt 2):251-8.

Liou, J.C., Yang, R.S., and Fu, W.M.(1998). Regulation of quantal secretion by neurotrophic factors at developing motoneurons in *Xenopus* cell cultures. *J. Physiol (Lond).*, 503 (Pt-1): 129-139.

Lledo, P.M., Vernier, P., Vincent, J.D., Mason, W.T., and Zorec, R. (1989). New approaches in the study of stimulus-secretion coupling in the anterior pituitary cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 301-317

Llinás R.R., and Greenfield, S.A. (1987). On line visualization of dendritic release of acetylcholinesterase from mammalian substantia nigra neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 3047-50.

Lovisetti-Scamihorn, P., Liang, F., Leitner, B., De Potter, W., and Winkler, H. (1999). Pig splenic nerve: peptides derived from chromogranins by proteolytic processing during axonal transport. *Regul. Pept.*, 79(1): 63-67.

Madjoubi, M.E., Metz-Boutigue, M.H., Garcia-Sablone, P., Theodosis, D.T., Aunis, D. (1996). Immunocytochemical localization of chromogranin A in the normal and stimulated hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *J. Neurocytol.*, 25(7): 405-16.

Mahata, M., Mahata, S., Fischer-Colbrie, R. and Winkler, H. (1993). Ontogenic development and distribution of mRNAs of chromogranin A and B, secretogranin II, p65 and synaptin/synaptophysin in rat brain. *Develop. Brain. Res.*, 76:43-58.

Mansour-Roebaey, S., Clarke, D.B., Wang, Y.-C., Bray, G.M., and Aguayo, A.T. (1994). Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 1632-36.

Marty, S., Carroll, P., Cellerino, A., Castren, E., Staiger, V., Thoenen, H., and Lindholm, D. (1996). BDNF promotes the differentiation of various hippocampal nonpyramidal neurons, including Cajal-Retzius cells in organotypic slice cultures. *J. Neurosci.*, 16(2): 675-87.

Matsumoto, S., Tanaka, K., Yamamoto, A., Nakada, H., Uchida, M. and Tashiro, Y. (1987). *Immunoelectron microscopic localization of DBH and chromogranin A in adrenomedullary chromaffin cells.* *Cell Struct. Funct.*, 12(5): 483-96.

Matthews, G. (1996). Neurotransmitter release. *Ann. Rev. Neurosci.*, 19: 219-33.

McEwen, B.S., and Grafstein, B. (1968). Fast and slow component of axonal transport of proteins. *J.B.C.* 38:494-508.

McFerran, B.W., Graham, M.E., and Burgoyne, R.D. (1998). Neuronal Ca²⁺ sensor 1, the mammalian homologue of frequenin, is expressed in chromaffin and PC12 cells and regulates neurosecretion from dense-core granules. *J.B.C.*, 273(353):22768-72.

McGuire, J.C., Green, L.A., and Furano, A.V. (1978). NGF stimulates incorporation of fucose or glucosamine into external glycoprotein in cultured rat PC12 pheochromocytoma cells. *Cell*, 15: 357-365.

Mecker, R., and Myers, R.D. (1979). ¹⁴C-aminoacid profiles in discrete hypothalamic regions during push-pull perfusion in unrestrained rat. *Neurosci.*, 4: 495-506.

Mehler, A., Varon, L., Silman, I., Homans, S., Ferguson. (1993). Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of acetylcholinesterase from the electric organ of the electric-fish, *Torpedo Californica*. *Biochem. J.*, 296: 473-479.

Mercer, I., del Fiacco, M., and Cuello, A.C. (1979) the smooth endoplasmic reticulum as a possible storage site for dendritic dopamine in substantia nigra neurons. *Experientia*, 35: 101-103.

Mesulam, M.M., and Geula, C. (1994). Chemoarchitecture of axonal and perikaryal acetylcholinesterase along information processing systems of the human cerebral cortex. *Brain Res. Bull.*, 33:137-153.

Meyer, W., Schardin, J., and Schlesinger, C. Distribution of acetylcholinesterase in the central nervous system of harvestmen. *Neurosci. Lett.*, 256(2):97-100.

Millar, T.J., and Chubb, I.W. (1987). The ultrastructural localization of acetylcholinesterase-like immunoreactivity in the chicken retina. *Brain Res.*, 421: 297-308.

Mizobe, F., Machiko, I., and Livett, B.G. (1984). Parallel but separate release of catecholamines and acetylcholinesterase from stimulated adrenal chromaffin cells in culture. *J. Neurochem.*, 42: 1433-38.

Mizuta, M., Kurose, T., Miki, T., Shoji-Kasai, Y., Takahashi, M., Seino, S., Matsukura, S. (1997). Localization and functional role of synaptogamin III in insulin secretory vesicles in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 46(12):2002-6.

Monnerie, H., Dastugue, B., and Meinel, A. (1997). In vitro differentiation of chick spinal cord neurons in the presence of Reissner's fibre, an ependymal secretion. *Brain Res Dev. Brain Res.*, 192(2):167-176.

Morris, M.J. and Pavia, J.M. (1998). Stimulation of neuropeptide Y overflow in the rat paraventricular nucleus by corticotropin-releasing factor. *J Neurochem.*, 71(4): 1519-24.

Muñoz, D.G., Kobylinski, L., Henri, D.D., George, D.H. (1990). Chromogranin A-like immunoreactivity in the human brain: distribution in bulbar and cerebral cortex. *Neuroscience* 34(3): 533-43.

Musick, J.R. (1979). Correlated release of acetylcholine and proteins from the neuromuscular junction. *Am. J. Physiol.*, 236:C255-C262.

Musick, J.R., and Hubbard, J.J. (1972). Release of protein from mouse motor nerve terminals. *Nature*, 237:279-281.

Myers R.D. (1972). Methods for perfusing different structures of the brain. In : *Methods in Psychobiology* (R.D. Myers, de.) Academic Press, New York, Vol 2, pp. 169-211.

Myers R.D., and Beleslin, D.B. (1970). The spontaneous release of 5-hydroxytryptamine and acetylcholine within the diencephalon of unaesthetized Rhesus monkey. *Exp. Brain Res.* 11:549-552.

Myers R.D., and Drucker-Colín, R.R., eds. (1974). "Neurohumoral coding of the brain function". pp. 480 (Plenum Press, New York).

Naor Z., Dan-Cohen, H., Hermon, J., and Limor, R. (1989). Induction of exocytosis in permeabilized pituitary by α - and β - type protein Kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 4501-4504.

Neal, M.J., and Bowery, N.J. (1979). Differential effects of veratridine and potassium depolarization on neuronal and glial GABA release. *Brain Res.*, 167: 337-43.

Neimoz_Gaillard, E., Bosshard, A., Regazzi, R., Cuber, C.J., Takahashi, M., Catsicas, S., and Abello, J. (1998). Expression of SNARE proteins in enteroendocrine cell lines and functional role of tetanus toxin-sensitive proteins inolecystokinin release. *FEBS Lett.*, 425(1): 66-70.

Niremberg, M. (1970). The flow of information from gene to protein. In: *Aspects of protein biosynthesis.* (C.F., Afinsen Jr., edit.) Academic Press, New York., pp.: 215-241.

Nieullon, A., Chéramy, A., and Glowinski, J. (1977). An adaptation of the push-pull cannula method to study the in vivo release of ^3H -dopamine synthesized from ^3H -tyrosine and pharmacological treatments. *J. Neurochem.* 28:819-828.

O'Connor, D.T., Cervenka, J.H., Stone, R.A., Parmer R.J., Franco-Bourland, R.E., Madrazo, I., and Langlais, P.G. (1993). Chromogranin A immunoreactivity in human cerebrospinal fluid : properties, relationship to noradrenergic neuronal activity, and variation in neurologic disease. *Neuroscience*, 56(4): 999-1007.

O'Connor, V Augustine, G.J., and Betz, H. (1994). Synaptic vesicle exocytosis: Molecules and models. *Cell.*, 76: 785-87.

Olive, M.F., and Maidment, N.T., Opioid regulation of pallidal enkephalin release: bimodal effects of locally administered mu and delta opioid agonists in freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285(3): 1310-16.

Palade, G. (1975). Intracellular aspect of the process of protein synthesis. *Science*, 189:347-358.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Palay, S.L., and Palade, G. (1955): The fine structure of neurons. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1: 69-68.

Perachia, C. (1981). Direct communication between axons and sheat glial cells in crayfish. *Nature*, 290: 597-598.

Peterson, G.M., Ginn, S.R., and Lanford, G.W. (1994). Fibers immunoreactive for nerve growth factor receptor in adult rat cortex and hippocampus mimic the innervation pattern of AChE positive fibers. *Brain Res. Bull.*, 33:129-136.

Phillipu, A. (1985). The use of push-pull cannulae for superfusing various hypothalamic areas in anesthetized and conscious, freely moving animals. In: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances, Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colin, eds.), Academic Press, Orlando, Fla. pp.249-270

Planas, A.M., Crouzel, C., Hinnen, F., Jobert, A., En, F., DiGiamberardino, L., and Tavitian, B. (1994). Rat brain acetylcholinesterase visualized with ¹⁴C-physostigmine. *Neuroimage*, 1(3):173-80.

Plattner, F., and Hinter, A. (1930). Die Spaltung von acetylcholin durch organextrakte und Korpreflussigkeiten. *Pflugers. Arch. Ger. Physiol.*, 225:19.25.

Pogorelov, A.G., Budantsev, A.Y., Pogorelova, V.N. (1993). Quantitative electron probe microanalysis of acetylcholinesterase activity in rat brain sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 41(12): 1795-1800.

Pokay, M., and Grant, P. (1984). Choline acetyltransferase and cholinesterases in the developing Xenopus retina. *J. Neurochem.*, 42: 1328-37.

Pyckock, C. (1980). Turning behavior in animals. *Neuroscience*. 5:461.

Raiteri, M., Marchi, M., Caviglia, A.M. (1986). Studies of a possible functional coupling between presynaptic acetylcholinesterase and high-affinity choline uptake in the rat brain. *J. Neurochem.*, 47: 1696-99.

Ramirez, U.D. (1985). The push-pull perfusion technique in neuroendocrinology. In *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances, Methods and Strategies* (A. Bayón and R.R. Drucker-Colin, eds.), Academic Press, Orlando, Fla. pp.249-270

Randall, W.R. (1994). Cellular expression of a cloned, hydrophilic, murine acetylcholinesterase. *J.B.C.*, 269(16): 12367-74.

Remblier, C., Jolimay, N., Wahl, A., Pariat, C., Piriou, A., Huguet, F. (1998). Extracellular dopamine and catabolites in rat striatum during lactic acid perfusion as determined by in vivo microdialysis. *Brain Res.*, 804(2):224-30.

Rodeman, H.P., Waxman, L., and Goldberg, A.L. (1982). The stimulation of protein degradation in muscle by Ca^{++} is mediated by Prostaglandin E_2 and does require de Ca^{++} activated release. *J.B.C.*, 257: 8716-23.

Rossi, S.G., and Rotundo, R.L. (1992). Cell surface acetylcholinesterase molecules on multinucleated myotubes are clustered over the nucleus origin. *J:B.C.*, 119(6): 1657-67.

Rothman, J.E. (1981). The Golgi apparatus: Two organelles in tandem. *Science*, 213: 1212-19.

Rotundo, L. R., (1980).. Secretion of Acetylcholinesterase: Relation to acetylcholine receptor metabolism. *Cell.*, 22: 595-602.

Rotundo, L. R., (1984). Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Proctl. Natl. Acad.Sci. USA.*, 81: 479-483.

Rotundo, R.L., and Carbonetto, S.T. (1987). Neurons segregate clusters of membrane-bound acetylcholinesterase along their neurites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 2063-67.

Rotundo, R.L., Gomez, A.M., Fernandez-Valle, C., and Randall, W.R. (1988). Allelic variants of acetylcholinesterase:genetic evidence that all acetylcholinesterase forms from avian nerves and muscles are encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:7805-7809.

Ryden, M.,Murray-Rust, J., Glass, D., Ilag, M., Trupp, M. (1995). Functional analysis of mutant neurotrophins deficient in low-affinity binding reveals a role for p75-LNGFR in NT-4. Signalling. *EMBO.J.* 14: 1979-90.

Sadoul, K., Berger, A., Niemann, H., Regazzi, R., Catsicas, S., and Halban, P.A. (1997a). SNAP-25 can self-associate to form a disulfide-linked complex. *Biol Chem.*, 378(10): 1171-16.

Sadoul, K., Berger, A., Niemann, H., Wellwe, U., Roche, P.A., Trimble, W.S., Regazzi, R., Catsicas, S., and Halban, P.A. (1997b). SNAP-23 is not cleaved by botulinum neurotoxin E and replace SNAP-25 in the process of insulin secretion. can self-associate to form a disulfide-linked complex. *J. Biol Chem.*, 272(52): 33023-7.

Saez-Valero, J., Tornel, P.L., Munoz-Delgado, E., Vidal, C.J. (1993). Amphiphilic and hidrophilic forms of Acetyl nad butyrylcholinesterase in human brain. *J. Neurosci. Res.* 35:678-689.

Saleh, T.M. (1997). Visceral afferent stimulation- evoked changes in the release of peptides into the parabrachial nucleus in vivo. *Brain Res.* 778(1): 56-63.

Salton, S.R., Margolis, R.G., and Margolis, R.K. (1983). Release of chromaffin granule by glycoproteins and proteoglycans from potassium-stimulated PC12 pheochromocytome cells. *J. Neurochem.*, 41:1165-70.

Salton, S.R.J., Margolis, R.J., and Margolis, R.K. (1983). Release of chromaffin granule by glycoproteins and proteoglycans from potassium stimulated PC12 pheochromocytoma cells. *J. Neurochem.*, 41: 1165-70.

Scott, C.E., Abdullah, L.H., and Davis, C.V. (1998). Ca²⁺ and protein kinase C activation of mucin granule exocytosis impermeabilized SPOC1 cells. *Am J. Physiol.*, 275(1 Pt-1):C285-92.

Scheeg, K.M., Futamachi, K.J., and Peacock, J.H. (1986). Characterization of acetylcholinesterase isoforms in septal and hipocampal cultures and cocultures. *Develop. Brain Res.*, 30: 221-230.

Schlaggar, B.L., De Carlos, J.A., O'Leary, D. (1993). Acetylcholinesterase as an early marker of the differentiation of dorsal thalamus in embrionic rats. *Develop. Brain Res.*, 75: 19-30.

Schubert , D., Kreutzberg, G.M., and Lux, H.D. (1972). Neuroplasmic transport in dendrites: effect of colchicine on morphology and physiology of motoneuronns in cat. *Brain Res.*, 47: 331-343..

Schubert , D. (1978). NGF induced alterations in protein secretion and substrate attached material of a clone nerve cell line. *Brain Res.*, 155:196-201.

Schumacher, M., Maulet, Y., Camp, S., and Taylor P. (1988). Multiple messenger RNA species give rise to the structural diversity in acetylcholinesterase. *J.B.C.*, 263(35): 18979-87.

Schwartz, J:H: (1993). Chemical Messengers: Small Molecules and Peptides. *Principles in Neuroscience*, (Kandel E., and Schwartz J:H., eds). Chap. 14., 213-224.

Schwarzenbrunner, U., Schmidel, T., Obendorf, D., Scherman, D., Hook, V., Fischer-Colbrie, R., Winkler, H. (1990). Sympathetic axons and nerve terminals: the protein composition of small and large dense-core and a tird type of vesicles. *Neuroscience*, 37(3): 819-27.

Schweitzer, E.S. (1993). Regulated and constitutive secretion of distinct molecular forms of acetylcholinesterase from PC12 cells. *J. Cell. Sci.*, 106: 731-740.

Schweitzer, E.S., and Kelly, R.B. (1985). Selective packaging of human growth hormone into synaptic vesicles in a rat neuronal-PC12- cell line. *J.B.,C.*, 101:667-676.

Shashoua, V.E. (1985). The role of brain extracellular proteins in neuroplasticity and learning. *Cell and Molec. Neurobiol.*, 5(1-2): 183-207.

Shashoua, V.E., and Holmquist, A.F. (1986). Extracellular fluid proteins in the goldfish brain : Evidence for the presence of proteases and esterases. *J. Neurochem.*, 47(3):738-743.

Shefler, J., Taube, Z., Medalia, O., Sagi-Eisenberg, R. (1998). Basic secretagogues activate protein tyrosine phosphorylation and release of arachidonic acid in mast cells via a novel protein Kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.*, 28(11):3468-78.

Shen, P.J., and Gundlach, A.L. (1998). Differential increases in chromogranins, but not synapsin I, in cortical neurons following spreading depression: implications for functional roles and transmitter peptide release. *Eur. J. Neurosci.*, 10(7): 2217-30.

Silver, A. (1974). *The biology of cholinesterases*. Elsevier, Amsterdam.

Simon, J.P., Bader, M.F., and Aunis, D. (1989). Effect of secretagogues on chromogranin A synthesis in bovine cultured chromaffin cells. *Biochem J.*, 260: 915-922.

Simpson, P.B., Challiss, R.A., Nahorski, S.R. (1995). Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *Trends. In Neurosci.*, 18(7): 299-306.

Sitges, M., and Chiu, L.M. (1995a). Characterization of the type of calcium channel primarily regulating GABA exocytosis from brain nerve endings. *Neurochem Res.*, 20(9):1073-80.

Sitges, M., and Chiu, L.M. (1995b). Omega -aga IVA selectively inhibits the calcium-dependent fraction of the evoked release of ³H-GABA from synaptosomes. *Neurochem Res.*, 20(9):1065-71.

Sitges, M., and Reyes, A. (1995). Effects of verapamil on the release of different neurotransmitters. *J. Neurosci. Res.*, 40:613-21.

Sitges, M., Chiu, L.M., and De la Fuente, J.R. (1990). The effect of verapamil on GABA and dopamine release does not involve voltage-sensitive calcium channel. *Brain Res.*, 534: 51-59.

Sitges, M., Chiu, L.M., and Gonzalez, L. (1993). Vesicular and carrier-mediated depolarization-induced release of ³H-GABA: Inhibition by verapamil and amiloride. *Neurochem Res.*, 18:1081-87.

Skau, K.A., and Brimijoin, S. (1978). Release of acetylcholinesterase from rat hemidiaphragms preparations stimulated through the phrenic nerve. *Nature*, 275: 224-226.

Small, D.H., Ismael, z., and Chubb, I.W. (1986). Acetylcholinesterase hydrolyses chromogranin A to yield low molecular weight peptides. *Neuroscience*, 19: 289-295.

Small, D.H., Moir, R.D., Fuller, S.J., Michaelson, S., Bush, A.I., Li, Q.X., Milward, E., Hilbisch, C., Widemann, A., Beyreuther, k., and Masters, C.L. (1991). A protease activity with acetylcholinesterase releases the membrane-bound form of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *Biochem.*, 30: 10795-99.

Smith, A.D., De Potter, , W.P., Moerman, E.J., and De Schaeppdryver, A.F. (1970). Release of dopamine-B-hydroxylase and chromogranin A upon stimulation of the splenic nerve. *Tissue and Cell.*, 2:547-568.

Spinedi, A., Luly, P., Farias, R.N. (1993). Does the fluidity of lipid environment modulate membrane-bound acetylcholinesterase ?. *Bioche. Pharmacol.*, 46(9): 1521-27.

Stone, G.C., Hammerschlag, R., and Bobinski, J.A. (1983). Fast transported glycoproteins and non glycosylated proteins contain sulfate. *J. Neurochem.*, 41; 1085-89.

Stone, G.C., Hammerschlag, R., and Bobinski, J.A. (1984a). Fast axonal transport of tyrosine sulfate-containing proteins: Preferential routing of sulfoproteins towards nerve terminals. *Cell and Mol. Neurobiol.*, 3(4) 249-262.

Stone, G.C., Hammerschlag, R., and Bobinski, J.A. (1984b). Involvement of coated vesicles in the initiation of fast axonal transport. *Brain Res.*, 291:219-228.

Sundler, F., Bötcher, G., Ekblad, e., and Häkansson, R. (1989). The neuroendocrine system of the gut. *Acta Oncologica.*, 28: 303-313.

Sweadner, K.J. (1981). Environmentally regulated expression of soluble extracellular proteins of sympathetic neurons. *J.B.V.*, 258: 4063-70.

Sweadner, K.J. (1983a). Post-translational modifications and evoked release of two large surface proteins of sympathetic neurons. *J. Neurosci.*, 3: 2504-17.

Sweadner, K.J. (1983b). Size, shape, and solubility of a class of releasable cell surface proteins from sympathetic neurons. *J. Neurosci.*, 3: 2518-24.

Taishin, T., and Ichida, T. (1994). Evidence for the involvement of protein phosphorylation in cyclic AMP-mediated amylase exocytosis from parotid acinar cells. *FEBS Lett.*, 340: 29-33.

Tasaka, K., Masumoto, N., Mizuki, J., Ikebuchi, Y., Ohmichi, M., Kurachi, H., Miyake, A., and Murata, Y. (1998). Rab 3B is essential for GnRH-induced gonadotrophin release from anterior pituitary cells. *J. Endocrinol.*, 157(2): 267-74.

Taylor, C.S., and Fleming, P.J. (1989). Conversion of soluble Dopamine-Beta-Hydroxylase to a membrane binding form. *J.B.C.*, 264(26): 15242-246.

Tedeschi, B., Wilson, D.L., Zimmerman, A., Perry, G.W. (1981). An axonally transported proteins released from sciatic nerve. *Brain Res.*, 211:175-178.

Teodosis, D.T. and MacVicar, B. (1996). Neurone glia interactions in the hypothalamus and pituitary. *Trends. Neurosci.*, 19: 363-367.

Thomas, D.M., and Elferink, L.A. (1998). Functional analysis of the C2A domain of synaptogamin 1: implications for calcium-regulates secretion. *J. Neurosci.*, 18(10):3511-20.

Thorton, V.F.(1982). Stimulation of calcium-dependent release of labelled protein from pulse-labelled mouse pituitary intermediate lobe tissue. *J. Physiol.*, 329: 425-437.

Tohei, A., Watanabe, G. and Taya, K.J.(1998). Hypersecretion of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in hypothyroid male rats as estimated with a push-pull perfusion. *Endocrinology*, 156(2):395-400.

Tong, J.H. and Hwang, O. (1989). Dopamine Beta-Hydroxylase: Biochemistry and Molecular Biology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 342-386.

Tooze, J., Kern, H.F., Fuller, S.D., and Howell, K.E. (1989). Condensation-sorting events in the rough endoplasmic reticulum of exocrine pancreatic cells. *J.B.C.*, 109: 35-50.

Toutant, J.P. (1989). Insect acetylcholinesterase : Catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog. Neurobiol.*, 32: 423-446.

Toutant, J.P., Richards, M.K., Krall, J.A., and Rosenberry, T.L. (1990). Molecular forms of acetylcholinesterase in two sublines of human erythroleukemia K562 cells. *Eur. J. Biochem.*, 187: 31-38.

Truding, R., Shelanski, M.L., and Morell, P. (1975). Glycoproteins released into cultured medium of differentiating murine neuroblastoma cell. *J.B.C.*, 250: 9348-54.

Tytell, M., and Lasek, R.J. (1984). Glial polypeptides transferred into the squid giant axon. *Brain Res.*, 324: 223-232.

Ungerstedt, U. (1971). Post-synaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of nigrostriatal dopamine system. *Acta. Physiol. Scand. (suppl.)*. 367: 69.

Ungerstedt, U. and Zetterström, T. (1982). Brain dialysis, A new in vivo technique for studying neurotransmitter release and metabolism. *Neurosci. Lett. (suppl.)* 10: 5493 (abstr.)

Urfer, R., Tsoulfas, P., Soppet, D., Escandón, E., and Parada, L.F. (1994). The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptor *trkC* and *gp75* and the design of a multifunctional human neurotrophin. *EMBO. J.*, 13:5896-5909.

Valentijn, K.M., Gumkowski, F.D., and Jamieson, J.D. (1998). The subapical actin cytoskeleton regulates secretion and retrieval in pancreatic acinar cells. *J. Cell Sci.*, 112 (Pt-1):81-96.

Verge, V.M.K., Richardsohn, P.M., Benoit, R., Riopelle, R.J. (1989). Histochemical characterization of sensory neurons with high affinity receptors for nerve growth factors. *J. Neurocytol.*, 18:583-91.

Viveros, O.H., Arqueros, L., and Kirshner, N. (1968). Release of catecholamines and Dopamine- β -Hydroxylase from the adrenal medulla. *Life Sci.*, 7: 609-618.

Volkandt, W. (1995). The synaptic vesicle and its targets. *Neuroscience*, 64(2): 227-300.

Walmsley, B., Alvarez, F.J., Fyffe R.E.W. (1998). Diversity of structures and function at the mammalian central synapses. *Trends. In Neurosci.*, 21(2): 81-88.

Wallace, B.G., Nitkin, R.M., Reist, N.F., Justin, R.F., Moayeri, N., and McMahan, U.N. (1985). Aggregates of Acetylcholinesterase induced by acetylcholine receptor-aggregating factor. *Nature*, 315(6020):574-577.

Warburton, A.L., and Santer, R.M. (1993). Localization of NADPH-Diaphorase and acetylcholinesterase activities of tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y immunoreactivity in neurons of hypogastric ganglion of young adult and aged rats. *J. Autonom. Nerv. System.*, 45:155-163.

Waschek, J.A., Pruss, R.M., Siegel, R.E., Eiden, E.L., Bader, M.F., and Aunis, D. (1989). Regulation of enkephalin, VIP, and chromogranin Biosynthesis in actively secreting chromaffin cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 309-323.

Watt, C.B., Su, Y.Y.T., and Lam, D.K. (1985). Enkephalins in vertebrate retina. *Prog. Retinal Res.*, 4: 221-242.

Weiler, R., Marksteiner, J., Bellman, R., Wohlfarter, t., Schber, M., and Fischer-Colbrie, R. (1990). Chromogranins in rat brain: Characterization, topographical distribution and regulation of synthesis. *Brain Res.*, 532: 87-94.

Weisel, T.N. Hubel, D.H., and Lam, D.H. (1974). Autoradiographic demonstration of ocular dominance columns in the monkey striate cortex by means of transneuronal transport. *Brain Res.*, 79: 273-279.

Weiss, P., and Hiscoe, H. (1948). *Experiments on the mechanisms of nerve growth.* *J. Exp. Zool.*, 107: 315-395.

Weston, J., and Greenfield, S.A. (1986). Release of acetylcholinesterase in the rat nigrostriatal pathway: relation to receptor activation and firing rate. *Neuroscience*, 17:1079-88.

Williams, R., Bäckström, A., and Kullander, K. (1995). Developmentally regulated expression of mRNA for neurotrophin high affinity (trk) receptors within chick trigeminal sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 7:116-28.

Williard, M., Cowan, W.M., and Vangelos, R.R. (1975). The polypeptide composition of intraaxonally transported proteins: Evidence for four transport velocities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71: 2183-87.

Winkler, H., and Fischer-Colbrie, R. (1992). The Chromogranins A and B: The first 25 years and future perspectives. *Neuroscience*, 49:497-528.

Wotherspoon, G., and Priestley, J.V. (1995). Co-expression of GAP-43 with dopamine-beta-hydroxylase in adult rat spinal cord. *Neuroreport*, 6(8):1113-17.

Wright, E.M., and Snider W.D. (1995). Neurotrophin receptor mRNA expression defines distinct populations of neurons in rat dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.*, 351: 329-38.

Yaksh, T.L. Felele, L.A., and Yamamura, H.I. (1974). Recovery of cholinesterase activity in the cerebrospinal fluid, brainstem, and plasma of unanaesthetized cat after irreversible cholinesterase inhibition. *Experimentia.*, 30:38-33.

Yao, W., and Godfrey, D.A. (1998). Immunohistochemical evaluation of cholinergic neurons in the rat superior olivary complex. *Microsc. Res. Tech.*, 41(3): 270-83.

Yavin, E., Hana, T., Gil, S., and Guroff, G. (1986). Nerve Growth Factor and gangliosides stimulated the release of glycoproteins from PC12 pheochromocytoma cells. *J. Neurochem.*, 46: 794-803.

Young, R.W., and Droz, B. (1968). The renewal of protein in retinal rods and cones. *J.C.B.*, 39: 169-184.

Younkin, S.G., Brett, R.S., Davey, B., and Younjin, L.H. (1978). Substances moved by axonal transport and release by nerve stimulation have an innervation-like effect on muscle. *Science*, 200:1292-95.

Zhang, H., Yasrebi-Nejad, H., and Lang, J. (1998). G-protein betagamma-binding domains regulate insulin exocytosis in clonal pancreatic beta² cells. *FEBS Lett.*, 424(3):202-6.