

27
2ej-



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Estudios Superiores
"Cuautitlán"

DETECCION DE PROTEINAS LIBERABLES EN EL
COMPLEJO ESTRIADO DEL CEREBRO
DE RATA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JOSE NICOLAS JIMENEZ PEREZ

ASESOR DE TESIS:

Q.F.B. LOURDES MONSERRAT SORDO CEDENO



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I.	INTRODUCCION.	1
II.	GENERALIDADES.	3
	II.1 El Sistema Nervioso.	3
	II.2 La Neurona.	10
	II.3 La Sinapsis	12
III.	ANTECEDENTES.	15
	III.1 Liberación de Proteínas.	18
	III.2 Liberación de Proteínas con Actividad Enzimática.	21
	III.3 Liberación en la Unión Neuromuscular.	28
	III.4 Liberación en Rebanadas de Tejido Nervioso.	32
	III.5 Liberación en Cultivo de Tejido Neuronal.	36
	III.6 Liberación de Proteínas en Sistemas "IN VIVO".	41
	III.7 Cánulas.	48
	III.8 Perfusiones.	59
	III.9 Ensayo Inmunoenzimático Relacionado a Enzimas.	69
IV.	OBJETIVO GENERAL.	71
V.	OBJETIVOS PARTICULARES.	72
VI.	MATERIALES Y REACTIVOS.	73
	VI.1 Animales de Experimentación.	74
	VI.2 Cánulas.	75
	VI.3 Coordinadas.	76
	VI.4 Soluciones Empleadas.	77

VII.	METODOS.	79
	VII.1 Anestesia.	79
	VII.2 Procedimientos Quirúrgicos.	79
	VII.3 Perfusión.	80
	VII.4 Recolección de las Muestras.	82
	VII.5 Protocolo de Perfusión.	82
	VII.6 Ensayo de las Muestras.	83
	VII.7 3H-GABA.	84
	VII.8 Inmunoglobulinas.	85
	VII.9 Liberación de Proteínas.	86
	VII.10 Lowry.	87
	VII.11 Bradford	87
	VII.12 Ensayo Inmunoenzimático.	88
VIII.	RESULTADOS.	90
	VIII.1 Perfusiones Basales.	93
	VIII.2 Perfusiones.	100
	VIII.3 Ensayo Inmunoenzimático de los Perfusados.	105
IX.	DISCUSION.	119
	IX.1 Análisis de los Niveles Basales.	122
	IX.2 Perfusiones con Liberación.	123
X.	CONCLUSIONES.	128
XI.	REFERENCIAS.	130

LISTA DE FIGURAS.

FIG.1 Modelo de Cánula de Perfusión de Gaddum.	52
FIG.2 Proyección Ortogonal de la Punta de la Cánula Desarrollada por Bayón y col.	54
FIG.3 Sistema de Perfusión "Push-Pull".	63
FIG.4 Hoja de Registro Para Perfusiones.	91
FIG.5 Curvas Estándar de Lowry y Bradford.	92
FIG.6 Curva de Titulación de Suero Normal de Rata.	94
FIG.7 Perfusión Basal de <i>Caudado putamen</i> .	95
FIG.8 Perfusión Basal de <i>Globus pallidus</i> .	96
FIG.9 Perfusión Accidentada.	98
FIG.10 Liberación de 3H-GABA.	101
FIG.11 Detección de Inmunoglobulinas.	103
FIG.12 Perfil de Liberación de Proteínas en <i>Caudado putamen</i> .	106
FIG.13 Perfil de Liberación de Proteínas en <i>Globus pallidus</i> .	107
FIG.14 Comparación de Proteínas Liberadas en <i>C. putamen</i> y <i>G. pallidus</i> .	108
FIG.15 Cuantificación de la Afinidad de los Anticuerpos Monoclonales.	110
FIG.16 Liberación de 3H-GABA.	111
FIG.17 Detección de Inmunoglobulinas.	112
FIG.18 Perfil de Liberación de Proteínas.	114
FIG.19 ELISA de Proteínas Liberadas en <i>Caudado putamen</i> .	115
FIG.20 ELISA de Proteínas Liberadas en <i>Globus pallidus</i> .	116
FIG.21 Comparación de Proteínas Liberadas empleando para su Detección la Técnica de ELISA.	118

I. INTRODUCCION

La liberación de sustancias neuroactivas de células nerviosas juega un papel crucial en los mecanismos de transmisión de la información. En los últimos años es claro que los llamados "neurotransmisores clásicos" representan solo un subgrupo de las sustancias neuroactivas liberables de células nerviosas.

Una gran cantidad de estudios han revelado que las células nerviosas liberan sustancias como péptidos y aminoácidos, y ultimamente se sabe que también se liberan proteínas que podrían participar en importantes funciones del sistema nervioso central.

De acuerdo con lo anterior cabe señalar la importancia de la caracterización de las macromoléculas proteicas liberadas, para poder comprender nuevas modalidades de comunicación neural. Por ello es necesario desarrollar métodos y estrategias que permitan la obtención y la cuantificación de dicho material proteico.

Para poder abordar el estudio de estas proteínas se empleó la técnica de perfusión "in vivo", en donde una cánula "push-pull" se introduce en el cerebro del animal, y nos permite estudiar la correlación de diferentes eventos bioquímicos que ocurren en un microambiente celular específico, esto mediante la inyección-extracción de una solución fisiológica.

Una vez obtenidos los perfusados es importante contar con las técnicas bioquímicas necesarias para poder evaluar el contenido del líquido de perfusión . Dentro de los múltiples ensayos que se realizan a los perfusados uno de los más importantes ha sido la cuantificación de proteínas liberadas tanto en condiciones basales como en presencia de un estímulo químico, esta determinación se ha manejado siempre bajo un contexto bioquímico tradicional, como es el ensayo de proteínas desarrollado por Lowry y col. o por el método de Bradford. Debido a una serie de limitantes que presentan estas técnicas es importante contar con nuevas metodologías que nos permitan una mejor aproximación al fenómeno en estudio.

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de una metodología que permita la determinación de las proteínas liberables con métodos que tengan una mayor resolución, reproducibilidad y especificidad. Para poder lograr esto se empleó la producción de anticuerpos monoclonales, así como el ensayo inmunoenzimático, dos técnicas que han tenido un gran desarrollo y aplicación dentro de las ciencias biológicas en la última década.

II. GENERALIDADES (1).

El sistema nervioso es el conjunto de estructuras funcionalmente especializadas mediante las cuales el organismo controla todas sus funciones y responde adecuadamente a los estímulos que recibe, tanto del medio externo como del medio interno. De dicha adecuación depende la posibilidad de adaptación al medio ambiente y por lo tanto la supervivencia.

Los estímulos consisten en cambios de energía que ocurren en el medio y pueden ser de diferente tipo: físicos (térmicos, mecánicos y electromagnéticos), y químicos; su conjunto constituye la información que el organismo recibe y a la cual debe de responder. Para esto, los organismos multicelulares cuentan con estructuras especializadas en el registro de dichos cambios, los receptores, cuya función es traducir los diferentes tipos de energía, en energía eléctrica, parte esencial de los impulsos nerviosos.

II.1 EL SISTEMA NERVIOSO (1,2).

El sistema nervioso se divide en central y periférico. Una parte del sistema central (encéfalo) está contenido en el cráneo,

y la otra en la columna vertebral (médula espinal). El sistema central constituye la mayor parte de las neuronas y se prolonga mediante ramificaciones que salen del alojamiento óseo para conectarse con otras células. Dichas ramificaciones y otra clase de neuronas que se encuentran fuera del sistema nervioso central constituyen el sistema nervioso periférico.

Se ha convenido en dividir al encéfalo en cinco porciones mayores: telencéfalo o cerebro terminal; diencéfalo o cerebro intermedio; mesencéfalo o cerebro medio; metencéfalo o cerebro posterior, y el mielencéfalo o médula oblongada. El telencéfalo y el diencéfalo forman el prosencéfalo o cerebro anterior. El metencéfalo y el mielencéfalo forman el rombencéfalo o cerebro posterior o caudal. El metencéfalo comprende al puente o protuberancia y al cerebelo, en tanto que el cerebro incluye al telencéfalo, al diencéfalo y la parte más rostral del mesencéfalo.

El cerebro se encuentra parcialmente dividido en dos mitades -los hemisferios cerebrales- por una profunda y vertical cisura longitudinal. Ambos hemisferios incluyen tanto a las estructuras telencefálicas como a la corteza cerebral, sustancia blanca profunda hasta la corteza blanca, a los núcleos basales y al cuerpo calloso. Un hemisferio cerebral abarca menos que una mitad del encéfalo debido a que no incluye porciones del diencéfalo ni del cerebro medio o mesencéfalo. Cada hemisferio cerebral se ha dividido convencionalmente en seis lóbulos: frontal, parietal, occipital, temporal, central y límbico. La corteza cerebral o sustancia gris que cubre la superficie del cerebro, se encuentra

cortada por incisuras llamadas surcos; y los pliegues salientes reciben el nombre de giros o circunvoluciones. Varios de los surcos mayores constituyen límites que dividen la corteza cerebral en lóbulos; a su vez, éstas regiones se encuentran subdivididas por surcos secundarios y terciarios. La extremidad de algunos lóbulos recibe el nombre de polo, por ejemplo, polo frontal, polo temporal y polo occipital.

En el interior del cerebro se encuentran una sucesión de cavidades denominadas sistema ventricular y están llenas de líquido cerebrospinal (LCE), dicho sistema esta subdividido de la manera siguiente: los ventrículos laterales son las cavidades de los hemisferios cerebrales, el tercer ventrículo es la cavidad del diencefalo, el acueducto cerebral es la del mesencefalo, y el cuarto ventrículo la del rombencefalo.

Dentro de las estructuras que comprende el telencefalo podemos encontrar:

La corteza cerebral, que es el manto del cerebro, compuesto por alrededor de 10 mil a 15 mil millones de neuronas y 50 mil millones de células gliales. Sus intrincadas redes son esenciales para la existencia de facultades intelectuales y para otras expresiones neurales elevadas. La corteza cerebral cubre alrededor de dos y medio pies cuadrados de superficie; su grosor varía desde 4 mm en el giro precentral hasta 1.5 mm en la corteza visual primaria, cerca del surco calcarino.

Los núcleos basales, que son complejos nucleares habitualmente clasificados como ganglios basales, comprenden el cuerpo amigdalóideo, el estriado y el claustro. El núcleo subtalámico, la sustancia nigra y el núcleo rojo se incluyen algunas veces, pero varios autores no consideran al cuerpo amigdalóideo (relacionado con el sistema límbico) como núcleo basal.

El cuerpo calloso es un grueso tracto nervioso que cruza la línea media, por lo que también es una comisura; que interconecta la neocorteza de ambos hemisferios y presenta varias porciones: el pico o rostro, la rodilla, el cuerpo y el esplenio.

Otras estructuras que encontramos en el telencéfalo son: la comisura anterior, la lámina terminal, el fornix, así como el septo pelúcido, la cisura cerebral transversa, el tentorium o tienda del cerebelo y el velo interposito.

El diencefalo se encuentra rodeado lateral y dorsalmente por los hemisferios laterales, y se prolonga caudalmente hasta el mesencefalo. El diencefalo tiene cuatro subdivisiones que son: epitálamo, tálamo, hipotálamo y subtálamo.

El epitálamo es una angosta porción del piso del diencefalo que incluye la estría medular del tálamo, la habenula, la comisura habenular, el cuerpo pineal y la comisura posterior; las tres primeras pertenecen al sistema límbico.

El tálamo, la división mayor del diencefalo, se encuentra por encima del surco hipotalámico, y es la estación integradora mayor, intercalada entre muchas estructuras subcorticales y la corteza cerebral.

El hipotálamo está colocado por debajo del surco hipotalámico, e incluye estructuras del tercer ventrículo. El hipotálamo contiene los centros integradores del sistema nervioso autónomo.

El subtálamo es una estación subcortical importante que participa en las actividades motoras voluntarias.

El mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo tienen ciertas características básicas similares: cada uno tiene un techo, un canal central dependiente del sistema ventricular, y dos porciones, la tegmental y la basilar.

En el mesencéfalo o cerebro medio, el techo esta constituido por la lámina cuadrigémina, que incluye un par de colículos superiores relacionados con el sistema óptico y un par de inferiores en relación con el sistema auditivo. La porción basilar la forman los pedunculos cerebrales, los que se componen del tegmento mesencefálico, la sustancia nigra y el pilar cerebral.

En el metencéfalo el techo esta constituido principalmente por el cerebelo y parte de los plexos coroideos del cuarto ventrículo. La porción basilar es el puente propiamente dicho.

El techo del mielencéfalo (médula oblongada o bulbo raquídeo) consta del resto de los plexos coroideos del cuarto ventrículo. El tegmento comprende una porción mayor de la médula oblongada, en tanto que la porción basilar la constituyen las pirámides.

La médula espinal, que en sentido cefálico se continúa con la médula oblongada, es un cilindro ligeramente aplanado en sentido anteroposterior, es decir, más ancho lateralmente, y termina caudalmente en forma de cono (cono medular) al nivel de la unión entre la primera y segunda vértebras lumbares. Esta en un corte transversal, presenta una forma parecida a la de una mariposa. La médula espinal está compuesta de sustancia blanca que rodea a la gris. La sustancia blanca consta de fibras mielinizadas que se orientan paralelamente al eje longitudinal de la médula; no existen en ella cuerpos celulares. La sustancia gris, en cambio, está formada por cuerpos celulares, y fibras ligeramente mielinizadas que se orientan en ángulo recto al eje longitudinal a la médula. A todo lo largo de la médula espinal se encuentran células gliales y vasos sanguíneos: la rica vascularización y las fibras poco mielinizadas producen el "color" de la sustancia gris, mientras que las fibras mielínicas dan su coloración a la sustancia blanca. La médula espinal tiene dos funciones principales: transmitir los impulsos que parten y llegan al encéfalo y servir de centro de la actividad refleja, lo primero ocurre a través de las vías ascendentes que llevan impulsos al encéfalo, en tanto que las vías descendentes llevan impulsos desde el encéfalo hasta los órganos efectores.

Desde el encéfalo y médula salen 12 pares de nervios craneales y 31 raquídeos o espinales respectivamente, los que se conectan a todos los organos efectores y receptores del organismo y así forman el llamado sistema nervioso periférico. Los troncos nerviosos, tanto craneales como espinales, están formados de haces de fibras nerviosas (axones y dendritas). Los unicos cuerpos de células nerviosas presentes en el sistema nervioso periférico son los de las neuronas sensitivas, reunidos en agrupaciones llamadas ganglios, cerca del encéfalo o la médula, y ciertas neuronas motoras del sistema autónomo.

En el sistema nervioso autonomo, las vías eferentes se distribuyen en una porción craneosacra o parasimpática y una porción toracolumbar o simpática. Debido a que en estos trayectos se encuentran interpuestos los ganglios pre y paravertebrales, o craneales y terminales, respectivamente, se les subdivide en una parte pre y otra postganglionar. Los somas de las fibras preganglionares de la médula espinal se encuentran en el asta lateral. En la división simpática, las fibras preganglionares son colinérgicas, numerosas y cortas, y los ganglios pueden formar dos cadenas paravertebrales, o formar parte de los plexos prevertebrales. Las fibras postganglionares adrenérgicas son largas y presentan una gran divergencia. En el parasimpático, las fibras preganglionares colinérgicas son largas, y los ganglios pueden encontrarse asociados a los nervios craneales, o hallarse próximos o incluidos en las paredes de las vísceras (ganglios terminales), por lo que las fibras postganglionares son cortas y colinérgicas.

II.2 LA NEURONA (1,4).

El tejido nervioso, como cualquier otro está constituido por células. De una manera general, está formado por dos tipos de células: las neuronas, y las células gliales o neuroglía. La mayor parte de la superficie celular está constituida por las prolongaciones y fibras que tanto las neuronas como las células gliales poseen. Este conjunto de prolongaciones, que se cruzan y forman intrincadas redes, recibe el nombre de neuropilo.

La característica más sobresaliente de las neuronas es su heterogeneidad, tanto morfológica como funcional. Todas poseen un cuerpo o soma celular que varía mucho en forma y tamaño (desde 6 hasta 80 μ m), del cual se extienden dos tipos de delgadas prolongaciones fisiológicamente distintas: las dendritas y el axón.

Las dendritas son generalmente múltiples, tan ramificadas que dan lugar al llamado "árbol dendrítico", y constituyen, desde el punto de vista fisiológico, el sistema receptor de las neuronas, es decir, las estructuras mediante las cuales éstas reciben el impulso nervioso proveniente de otras neuronas. En muchos casos las dendritas poseen numerosos salientes pequeños que recuerdan las espinas de una rama, por lo que se les llama espinas dendríticas. En el interior de las dendritas hay mitocondrias, sustancia de Nissl, neurotúbulos y ocasionalmente neurofilamentos. En cambio el axón es una prolongación generalmente única al salir del soma, que tiene ramificaciones a distancia considerable de él.

El axón fisiológicamente representa el sistema eferente de la neurona, es decir, la estructura a través de la cual la neurona envía el impulso nervioso hacia otras neuronas, o hacia una célula efectora final como es la célula muscular. Los axones contienen también en su interior mitocondrias, neurofilamentos y neurotúbulos, en mayor proporción que en las dendritas, pero no sustancia de Nissl, salvo en su porción inicial, que se llama cono axónico.

La porción terminal del axón, llamada terminal axónica o terminal nerviosa, es una estructura bien diferenciada, que tiene varias características importantes tanto morfológicas como funcionales. Estructuralmente se caracteriza por ser un ensanchamiento del axón, generalmente redondeado, que posee en su interior, además de las mitocondrias, un gran número de vesículas de aproximadamente 500 Å de diámetro, llamadas vesículas sinápticas, así como un engrosamiento característico de su membrana en un sitio específico de ella. Este sitio, en proximidad con un sitio análogo de la membrana de una dendrita o un soma neuronal de otra neurona, constituye la sinapsis, que es la unidad anatómico-fisiológica de la comunicación interneuronal.

Además de las neuronas existen en el sistema nervioso central células morfológicamente distintas a las neuronas, que no forman sinapsis ni conducen el impulso nervioso, y que conservan su capacidad de reproducirse toda la vida. Estas células, llamadas células gliales o neuroglía son en conjunto por lo menos 10 veces más numerosas que las neuronas y fueron consideradas por mucho

tiempo sólo como células de sostén del tejido nervioso, pero en la actualidad se sabe que llevan a cabo también otras funciones de importancia. Se reconocen dos grupos de células gliales: la macroglía, que es de origen ectodérmico e incluye los astrocitos y las células de oligodendroglía u oligodendrocitos, y la microglía, que son pequeñas células de origen mesodérmico, también se considera entre la neuroglía a las células endoteliales.

II.3 LA SINAPSIS (3,4).

El término "sinapsis" fue creado por Sherrington para denominar la zona de contacto entre dos neuronas o entre una neurona y otro tipo de célula; por ejemplo, las fibras musculares esqueléticas. En las sinapsis se distinguen dos elementos: el presináptico y el postsináptico. El primero es un engrosamiento de las ramificaciones axónicas terminales (el botón sináptico) y el segundo es la célula con que hace contacto. Ambos elementos están separados por un espacio, el hiato sináptico.

En las sinapsis del sistema nervioso central, el grosor del hiato es unas dos o tres veces mayor que el grosor de la membrana celular (de 80 a 100 Å); en la unión neuromuscular el hiato es mayor y la fibra muscular tiene una serie de pliegues muy profundos en la zona de contacto (placa motora) con la terminal nerviosa. Aunque el elemento postsináptico es diferente en este último caso las características generales del presináptico son

semejantes en ambos. Como se ha dicho, la sinapsis es la unidad comunicativa del sistema nervioso y transmite señales eléctricas unidireccionales: del elemento presináptico al postsináptico.

Hay varias clases de sinapsis. La transmisión sináptica puede ser directa (sinapsis eléctrica) o por medio de la liberación de sustancias químicas (sinapsis química). En el caso de las sinapsis eléctricas, ambos elementos se comunican por las llamadas uniones comunicantes, que son una serie de canales constituidos por proteínas. Estas uniones ofrecen poca resistencia al flujo de electricidad y, por tanto, la conducen de un lado a otro; las sinapsis eléctricas son abundantes en animales inferiores y relativamente escasas en los vertebrados. Por el contrario, en estos últimos predominan las sinapsis químicas.

Los botones presinápticos de las sinapsis químicas se distinguen por la abundancia de vesículas sinápticas. Estas vesículas suelen ser aún más abundantes alrededor de ciertas zonas de la membrana, que se ven más oscuras (zonas electrodensas) en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica. Las vesículas sinápticas contienen al neurotransmisor o neuromodulador y su membrana se funde con la membrana externa del botón, para después abrirse y liberar su contenido en el hiato sináptico. Este proceso (exocitosis) es igual al que ocurre en las células glandulares. El neurotransmisor (o neuromodulador) liberado se combina con una proteína que forma parte de la estructura de la membrana postsináptica; estas proteínas se denominan de manera genérica "receptores membranales" y, al unirse con el neurotransmisor,

inducen un cambio en la permeabilidad membranal para el flujo de iones. Dicho flujo ocasiona cambios eléctricos a través de la membrana postsináptica.

III. ANTECEDENTES

Desde los trabajos de los grandes anatomistas del siglo XIX, los enfoques tomados en el estudio del sistema nervioso han sufrido cambios notables. El hecho de aceptar a la neurona como una unidad independiente, tanto desde el punto de vista anatómico como funcional, llevó a la idea de que el entendimiento de los mecanismos que permitan la comunicación entre dos neuronas daría las bases para explicar el funcionamiento del sistema nervioso. De ahí que en el siglo XX los estudiosos del sistema nervioso hayan enfocado su atención principal sobre los mecanismos determinantes de la comunicación neuronal y su control (3).

El nombre de neurona fue dado a la célula nerviosa por Waldeyer, pero su descubrimiento se acredita a Ehrenberg, quien la describió en la corteza cerebral y en los ganglios espinales en 1833. Fontana en 1871 hizo la primera descripción detallada de la fibra nerviosa. Remak, entre 1836 y 1834, identificó las fibras mielínicas y amielínicas (estas últimas se llamarían más tarde fibras de Remak) y sugirió la posible continuidad entre la célula y la fibra nerviosa (3).

La neuroanatomía de la segunda mitad del siglo XIX se caracterizó por la famosa controversia entre los que postulaban la continuidad citoplásmatica entre las células nerviosas a través de

una red de fibras y los partidarios de la independencia anatómica de las neuronas, cuya relación sería solamente por contigüidad (3).

Los estudios de Walter sobre la degeneración nerviosa confirmaron el concepto de individualidad anatómica de las neuronas, al demostrar que la lesión de la célula nerviosa no afecta a las que están en relación con ella. His al investigar el desarrollo de las neuronas y Forel, mediante el método de degeneración retrógrada y la técnica de impregnación de plata de Golgi, contribuyeron considerablemente a fundamentar la teoría neuronista cuyo máximo exponente fue Cajal, quien aportó pruebas contundentes de la misma (3).

Hacia 1891, Waldeyer, después de hacer una evaluación de las evidencias derivadas de las investigaciones mencionadas, enunció la doctrina neuronal, en donde postula que el sistema nervioso se encuentra formado por unidades independientes conocidas como neuronas y la interacción entre estas células conforma las bases del funcionamiento nervioso. Aunque Waldeyer no hizo contribuciones originales al respecto, cooperó enormemente a divulgar el concepto de la neurona como unidad morfológica y funcional (3).

La introducción del concepto de sinapsis por Sherrington, para denotar el sitio en que las neuronas se ponen en contacto y la subsecuente comprobación confirmó las ideas de los neuronistas (4).

El origen de la teoría química de la transmisión nerviosa puede remontarse a Du Bois Raymond quien postuló, en 1848, la secreción de una sustancia excitadora como causante de la contracción muscular. De manera más formal, T. R. Elliot sugiere, en 1904, que la adrenalina imita la acción de los nervios simpáticos y actúa como un transmisor en la glándula adrenal. Sin embargo, esta teoría no fue tomada en consideración hasta 20 años después, cuando O. Loewi demostró que al perfundir un corazón de rana y simultáneamente estimular el nervio vago con electricidad, el latido del corazón disminuye o se detiene; y que cuando en el fluido que bañaba a este órgano se coloca otro corazón sin estimular, se induce una inhibición del latido. Concluyó que el estímulo nervioso induce la liberación de una sustancia inhibidora. Estudios posteriores demostraron que tal sustancia era la acetilcolina. Sin embargo, el paso decisivo para que la teoría química de la transmisión nerviosa se aceptara lo debemos a los estudios que Dale y Feldberg hicieron en 1936 sobre los nervios motores del músculo esquelético de mamíferos. Estos investigadores encontraron que cada vez que se estimulaba el nervio podía demostrarse la liberación de acetilcolina (4).

Posteriormente Loewi repitió este experimento, en donde perfundió y estimuló los nervios excitadores del corazón de rana, y aplicó el líquido de perfusión a un segundo corazón no estimulado, observando su aceleración. La sustancia liberada por los nervios simpáticos fue identificada como noradrenalina en 1946 por el fisiólogo sueco Ulf Von Euler quien la aisló e identificó como el transmisor químico en las terminales nerviosas de las fibras

postganglionares del sistema nervioso simpático. Los estudios detallados de Axelford han demostrado que la noradrenalina es un transmisor en el cerebro así como en el sistema nervioso periférico (4).

Hasta esta época los criterios aplicados para el estudio de los mediadores químicos involucrados en la comunicación neuronal eran básicamente dos: la presencia de la sustancia en cuestión en altas concentraciones en el sistema nervioso y la identificación de una acción específica de la misma sobre la excitabilidad neuronal que mimetizara la actividad de la sustancia natural. Estudios posteriores añadieron nuevos parámetros críticos como la liberación selectiva durante la actividad nerviosa y la existencia de un sistema que hiciera posible la terminación de la acción del mediador. Este tipo de enfoque experimental siguió utilizandose como modelo cuando se inicio el estudio de los mediadores químicos en el sistema hervioso de vertebrados. Con estos criterios pudieron identificarse varios aminoácidos como posibles transmisores: ácido gamma aminobutírico, glicina y ácido glutámico entre otros (4).

III.1 LIBERACION DE PROTEINAS.

En los últimos años se han acumulado una serie de evidencias experimentales que sugieren que aparte de los neurotransmisores existen otras sustancias también liberables de las células

nerviosas. Entre estas sustancias, las proteínas y quizás en especial enzimas, son las que han abarcado el mayor interés en cuanto a su estudio.

Dentro de los primeros estudios sobre la liberación de proteínas, y como antecedente de la liberación de éstas en células nerviosas, se pueden mencionar los trabajos de Banks y Helle (5), quienes observaron la liberación simultánea de catecolaminas y proteínas al estimular químicamente las células cromafines de la médula adrenal de bovinos. Tomando esta misma línea Kirshner y col. (6) en 1967 observaron la secreción de catecolaminas de la médula adrenal y que esta es acompañada por la liberación de una proteína soluble proveniente de los granulos cromafines y que dicha liberación obedece a un proceso de exocitosis. Al estudiar más detalladamente el líquido de perfusión se observó la presencia de una enzima, la dopamina- β -hidroxilasa, la cual también está localizada en las vesículas de los granulos cromafines y que se libera al mismo tiempo que las catecolaminas (7).

Apoyado en estos resultados Smith propone que un mecanismo análogo de secreción puede ocurrir en los nervios simpáticos, ya que las células cromafines de la médula adrenal son originadas en una cresta neural y por lo tanto los mecanismos de liberación de catecolaminas puede ser el mismo tanto en nervios simpáticos como en células cromafines (8), pero la idea fue descartada cuando en un congreso se argumentó que las células nerviosas eran diferentes a las de la médula adrenal y que los neurotransmisores presentaban un peso molecular pequeño, sintetizándose en las terminales

nerviosas, también se supuso que la secreción de proteínas por neuronas era improbable, debido a que las terminales nerviosas no contenían ribosomas y como consecuencia no podían sintetizar proteínas.

Más adelante Geffen y col. (9), utilizando técnicas de inmunofluorescencia, proporcionaron evidencias de que los componentes proteicos de las vesículas noradrenérgicas eran sintetizados en el cuerpo celular de las neuronas, y de ahí transportados a las terminales nerviosas por un flujo axoplásmico y a su vez podían ser liberadas de estas por un estímulo nervioso, observándose que esta liberación va a ser dependiente de Ca^{++} (10).

Actualmente se sabe que los gránulos de las células cromafines contienen nucleótidos y catecolaminas, así como un considerable número de proteínas y péptidos que están relacionados con las catecolaminas. Dentro de este grupo de proteínas las más importantes son las cromograninas, de donde destaca la cromogranina A, el miembro mayoritario de esta familia representando aproximadamente el 40 % de la proteína total de las vesículas (11).

Estudios citológicos y bioquímicos han demostrado que en las terminales noradrenérgicas se encuentran dos tipos de vesículas: unas de gran tamaño y otras pequeñas, siendo las primeras en donde se encuentra la dopamina-B-hidroxilasa (soluble y en membrana) así como la cromogranina A y otras cromograninas (8).

III.2 LIBERACION DE PROTEINAS CON ACTIVIDAD ENZIMATICA.

En los últimos años la enzima acetilcolinesterasa ha adquirido la distinción de ser una de las neuroenzimas mejor estudiadas. Diversos estudios y concomitantes avances se han llevado a cabo en relación a su mecanismo de acción, la naturaleza de su sitio activo, su distribución y localización en tejidos y su función, al menos en el ganglio y la unión neuromuscular (4).

Esta enzima existe en diferentes formas moleculares que probablemente llevan a cabo funciones diversas a través de distintos mecanismos. La acetilcolinesterasa es una larga glucoproteína que comprende al menos seis diferentes formas estructurales y que desafortunadamente su secuencia de aminoácidos aún no se conoce en su totalidad. En el tejido nervioso, la acetilcolinesterasa más abundante es la forma globular C4 y al parecer la forma A12 es la forma predominante que se destina por transporte axonal hacia las terminales nerviosas, posiblemente para su liberación (4).

En un principio se creía que toda la acetilcolinesterasa se encontraba unida a membranas (12) a pesar de que se había observado su presencia en los espacios extracelulares de la placa motora y del sistema nervioso central (13).

Es esta enzima la que mejor ha sido estudiada como representante de proteínas liberables en el sistema nervioso central. A pesar de que ya en 1930 Plattner y Hinter reportaron la

existencia de actividad de acetilcolinesterasa en el LCE de humanos, poca atención se le ha dado al estudio del origen de esta enzima en el LCE.

A simple vista parecen existir 2 posibles fuentes de origen que explicarían la presencia de acetilcolinesterasa en el LCE. Una posibilidad es que esta enzima provenga del plasma sanguíneo y que llegue al LCE al igual que otros constituyentes proteicos, a través de los plexos coroideos (14). La otra posibilidad es como lo han señalado otros autores, que su origen radique en el tejido nervioso del cerebro y/o de la médula espinal (15).

La primera posibilidad no parece ser muy razonable ya que en el plasma existe solo la colinesterasa no específica, en cambio el LCE contiene actividad de acetilcolinesterasa.

La segunda posibilidad parece ser más razonable en base al hecho de que muchas neuronas del sistema nervioso central contienen acetilcolinesterasa (16) incluyendo aquellas que están en contacto directo con el LCE (17), de este modo la enzima podría liberarse al LCE ya sea como un resultado de algún daño o muerte neuronal o como parte de un proceso de liberación fisiológico. La posibilidad de que la acetilcolinesterasa sea liberada de neuronas fue estudiada por Chubb y Smith (18, 19), los cuales mostraron que un tejido periférico que recibe inervación colinérgica como es la médula de la glándula adrenal, puede liberar una isoenzima de acetilcolinesterasa cuando este se trata con varios agentes despolarizantes.

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

En 1979 Greenfield y Smith (20) continuaron estudiando de manera más fina las bases fisiológicas de la actividad de acetilcolinesterasa encontrada en el LCE. Esta vez estimularon eléctricamente el núcleo caudado, la sustancia nigra y el hipotálamo lateral y midieron niveles de acetilcolinesterasa obtenidos en cisterna magna y ventrículo lateral del conejo. Los resultados mostraron que la estimulación de estos tres sitios anatómicos produce una elevación de los niveles de esta enzima en el LCE pero fundamentalmente en el obtenido en cisterna magna.

En los últimos trabajos al respecto, de Greenfield y colaboradores se ha sugerido que el origen de la acetilcolinesterasa liberada extracelularmente, ya sea espontáneamente o evocada por algún factor despolarizante, parece no residir en neuronas dopaminérgicas. Existen además también varias evidencias que sugieren que la función de esta acetilcolinesterasa (la isoenzima V) tendría otra función distinta de la hidrólisis de acetilcolina:

- 1.- Se ha demostrado que la acetilcolinesterasa soluble se almacena independientemente de la acetilcolina en el retículo endoplásmico liso (21).

- 2.- De las cinco isoenzimas solubles de la acetilcolinesterasa, solo una (isoenzima V) es específicamente liberada.
- 3.- La isoenzima V tiene la misma movilidad electroforética que la acetilcolinesterasa encontrada en el LCE.
- 4.- La liberación de acetilcolinesterasa de neuronas centrales no es modificada por agonistas o antagonistas colinérgicos.
- 5.- Desde el punto de vista anatómico la sustancia nigra es un buen sitio para mostrar que la acetilcolinesterasa liberada de esta estructura no esta ligada a la actividad colinérgica ya que: a) existe un desproporcionado exceso de acetilcolinesterasa en relación a la mínima cantidad de acetilcolina y su enzima sintetizadora la colín acetil transferasa; b) la localización de acetilcolinesterasa está muy asociada a la dopamina nigral ya que se encuentra principalmente en células dopaminérgicas de la pars compacta y además se desarrolla en paralelo con este neurotransmisor en el curso de la ontogenia; c) la acetilcolinesterasa del líquido extracelular parece tener una acción directa sobre el disparo de las células dopaminérgicas independientemente de la hidrólisis de la acetilcolina; d) es posible que la acetilcolinesterasa de origen dopaminérgico tenga una función en la transmisión peptídica ya que se ha mostrado en experimentos in vitro que es capaz de hidrolizar sustancia P y encefalinas (22); e) la liberación de acetilcolinesterasa de la sustancia nigra ha sido demostrada indirectamente in

vitro e in vivo.

Así mismo, Chubb y col. describieron en 1983 (23) algunas evidencias que señalan que la acetilcolinesterasa posee características suficientes como para denotar a esta enzima como un "neuropéptido":

- 1.- Existen suficientes evidencias que muestran que la acetilcolinesterasa no está concentrada solamente en el espacio sináptico, sino que cantidades significativas se encuentran almacenadas intracelularmente. La enzima se encuentra en el retículo endoplásmico en el soma, axón y en el aparato de golgi. Es importante señalar que éstas células incluyen células endócrinas y también neuronas no colinérgicas.
- 2.- Parte de esta enzima existe en forma soluble y fácilmente extraíble de homogenados.
- 3.- Existen fuertes evidencias que señalan que la acetilcolinesterasa es secretada de distintas células, tanto el sistema nervioso periférico como en el sistema nervioso central. La liberación de neuronas y de células endócrinas es inducida por estimulación y dependiente de Ca^{++} . Además, la forma molecular que se libera es específica, a pesar de que existen otras cinco formas moleculares diferentes.

- 4.- Se ha demostrado claramente su actividad de peptidasa, por la habilidad de hidrolizar encefalinas y sustancia P.
- 5.- La concentración de acetilcolinesterasa varió marcadamente con la actividad de retina de pollo y estos cambios fueron paralelos a los encontrados con encefalinas.

Estas evidencias sugieren que la acetilcolinesterasa es almacenada y liberada de neuronas y que posee un efecto fisiológico en células efectoras.

Para finalizar esta descripción de estudios sobre la liberación de acetilcolinesterasa de células nerviosas, cabe mencionar que recientemente Weston y Greenfield (24) sugirieron que la liberación de una enzima en el estriado, estaría relacionada con la frecuencia de disparo de neuronas nigroestriatales, pero que la liberación de acetilcolina en la sustancia nigra es independiente de potenciales de acción mediados por Na^+ , pero probablemente asociado con conductancias dendríticas específicas de Ca^{++} . Por otra parte Small y col. (25) mostraron fuertes evidencias que señalan que acetilcolinesterasa posee una actividad de peptidasa similar pero no idéntica a tripsina. Estos autores mostraron que acetilcolinesterasa hidroliza cromogranina A (una de las principales proteínas solubles, encontradas en células cromafines de la médula de la glándula adrenal) para producir diferentes polipéptidos de peso molecular menor.

Otra de las proteínas con actividad enzimática que se ha observado su liberación en células nerviosas es la dopamina-B-hidroxilasa, la cual se va a encontrar primordialmente en los gránulos cromafines de las células de la médula de la glándula adrenal. Una de las características de estos gránulos es que un 77 % de la proteína total es liberada por lisis de la partícula. La proteína cromogranina A representa aproximadamente el 40 % del total proteico soluble (26). La enzima dopamina-B-hidroxilasa representa también otro porcentaje importante del total proteico soluble de estos gránulos (7).

En 1965, Banks y Helle (5) mostraron por primera vez que la cromogranina A se encuentra en perfusados de glándulas adrenales estimuladas y ausente en glándulas adrenales no estimuladas eléctricamente. Posteriormente Viveros y col. en 1968 (7) mostraron también que la dopamina-B-hidroxilasa se libera por estimulación de la glándula adrenal.

Ambas proteínas se encuentran también en vesículas noradrenérgicas del nervio esplénico y la lisis de estas vesículas produce que la mayor parte de la cromogranina A (27) y hasta un 20% de la dopamina-B-hidroxilasa (28) se detecten como proteína soluble. Uno de los hallazgos que proporcionó una de las más convincentes evidencias sobre el origen de ambas proteínas en el nervio esplénico, fue dada por Smith y col. en 1970 (29). Estos autores mostraron la correlación entre las cantidades de dopamina-B-hidroxilasa, cromogranina A y noradrenalina, ya que no hay duda que noradrenalina se libera del nervio, se puede concluir

con bastante certeza que dopamina-B-hidroxilasa y cromogranina A se liberan junto con el neurotransmisor de las terminales nerviosas del nervio esplénico.

Estudios sobre la composición de fracciones subcelulares de axones del nervio esplénico han demostrado que dopamina-B-hidroxilasa y cromogranina A son componentes de vesículas noradrenérgicas (vesículas grandes y densas). Por otra parte ya De Potter y Smith (10, 29), habían demostrado que la liberación de ambas proteínas del nervio esplénico de becerro, era dependiente de la presencia de Ca^{++} en el medio de perfusión. Estas evidencias parecen indicar que el proceso de exocitosis es el mecanismo por el cual estas proteínas se liberan al medio extracelular.

III.3 LIBERACION EN LA UNION NEUROMUSCULAR.

La unión neuromuscular ha sido una de las preparaciones in vitro más estudiadas con respecto a la liberación de proteínas de células nerviosas. Los trabajos a este respecto llevados a cabo por Musick y Hubbard (30), mostraron que la estimulación del nervio frénico produce la liberación de proteínas que es dependiente de Ca^{++} pero independiente del hecho de que el músculo este activo o paralizado. Bray y col. mostraron que cuando las terminales nerviosas del nervio frénico se exponen a un medio con concentraciones altas de K^+ , la liberación de proteínas marcadas

radioactivamente es evocada. Posteriormente mostraron que el bloqueo de la liberación de acetilcolina produce una acumulación de proteínas transportadas axonalmente, en o cerca de las terminales nerviosas del nervio frénico (31).

También se ha observado que en terminales colinérgicas existe una liberación de proteínas y que quizás también tengan un origen vesicular. Cabe recordar que Whittaker y col. en 1974 (32) ya habían demostrado que las vesículas colinérgicas aparte de contener acetilcolina y ATP, contenían una proteína soluble.

Más adelante, Musick continuó estudiando este fenómeno con más profundidad (33), usando la preparación de nervio frénico-hemidiafragma de la rata. Este investigador mostró que la estimulación eléctrica del nervio paralizado con curare, produce una mayor liberación de material reactivo a Lowry (MRL) en comparación con controles previos a la estimulación.

Siguiendo con los estudios de liberación de proteínas en la preparación neuromuscular, Youkin (34) realizó otro interesante estudio. Para tales objetivos utilizó la preparación nervio ciático-músculo extensor digitorum longus (EDL) y examinaron dos propiedades del músculo: la actividad de colinesterasa y la sensibilidad a acetilcolina, los cuales son dramáticamente influenciados por la innervación.

Para comprobar el transporte axonal, seccionaron los nervios siáticos de ambos lados de doce ratas, se tomaron segmentos del

nervio control y cuatro días después de la sección se obtuvo de la zona proximal a la sección (lugar donde deberían de concentrarse, si existen, sustancias transportadas axonalmente) un segmento de 2.5 mm correspondiente al nervio "enriquecido". Al comparar el cultivo de músculos con segmentos del nervio control y segmentos de nervio enriquecido comprobaron que tanto la actividad de colinesterasa como la sensibilidad a la acetilcolina fueron significativamente mayor en músculos cultivados con segmento "enriquecido". Para determinar si músculos inervados contienen sustancias tróficas que estarían ausentes o en bajas concentraciones en músculos denervados, cultivaron músculos EDL con extractos de músculos normalmente inervados. Otra vez la actividad de colinesterasa y la sensibilidad a la acetilcolina de los músculos cultivados con extractos de músculos inervados fueron significativamente mayores comparados con músculos denervados. Sin embargo, cuando bloquean la liberación vesicular presináptica con Mg^{++} (10mM) redujeron significativamente la liberación de estas sustancias. De este modo los autores concluyeron que las sustancias que poseen una influencia sustancial y muy significativa de inervación, estudiadas por la actividad colinesterasa y por la sensibilidad colinérgica, se mueven por el axón, se liberan por el nervio por estimulación y están presentes en músculos inervados y aparentemente ausentes en músculos denervados. Cabe mencionar que aunque los autores no hablan aquí de sustancias proteicas, los estudios de Musick sugieren fuertemente que también en este caso se trate de sustancias de naturaleza proteica (33).

Uno de los trabajos pioneros en relación a la transferencia trans-sináptica de proteínas en un sistema in vitro, fue llevado a cabo por Korr y col. en 1967. Estos autores usando autorradiografía mostraron que sustancias marcadas con ^{32}P y ^{14}C e inyectadas en el núcleo hipogloso y al cabo de algunos días llegan de manera específica a las células musculares de la lengua. En cambio cuando la marca era introducida en el LCE esta llegaba indiscriminadamente a todos los distintos tipos celulares encontrados en la lengua (35).

De esta manera los autores concluyen que cuando sustancias radioactivas son introducidas selectivamente en las neuronas hipoglosales, estas o sus derivados, se transportan vía axonal específicamente a las células musculares de la lengua. En un trabajo posterior (36) se hicieron análisis más refinados. En este estudio se efectuó la inyección de ^3H -Leucina en el núcleo hipoglosal del conejo y analizaron las sustancias marcadas que llegaron a la lengua a los días 1, 12, 22 y 34 posterior a la inyección de la marca. Este análisis demostró que el contenido proteico era diferente para los cuatro períodos mencionados.

Los autores tratan de explicar el posible origen de estas cuatro distintas "ondas proteicas" y sugieren que: las proteínas del periodo uno (primer día) se deben atribuir al transporte axonal rápido, el cual lleva fundamentalmente elementos estructurales. Las proteínas del periodo dos (12 días) corresponden a proteínas insolubles con actividad específica alta y algunas proteínas solubles que llegan por medio de transporte

axonal lento. Las proteínas del periodo tres (22 días) serían proteínas solubles con actividad específica alta las cuales se van retrasando en su paso del nervio al músculo. Las proteínas del periodo cuatro (34 días) probablemente representa el arribo de proteínas insolubles correspondientes a un gradiente próximo-distal formado a lo largo del nervio en el periodo de los 22 a los 34 días. Aunque estos resultados no eliminan la posibilidad de que las proteínas radioactivas, solubles e insolubles encontradas en el músculo están confinadas a las terminales nerviosas, evidencias previas por medio de autorradiografía y otros estudios sugieren que estas proteínas, o parte de ellas son liberadas en las terminales nerviosas.

III.4 LIBERACION EN REBANADAS DE TEJIDO NERVIOSO.

También se han realizado trabajos sobre liberación de proteínas en rebanadas de tejido nervioso. En un trabajo del grupo de Shashoua, Duffy y col. (37) mostraron que la potenciación a largo plazo (PLP) de rebanadas de tejido del área hipocampal produce un aumento en la incorporación de ^{14}C -valina en proteínas que son posteriormente liberadas al medio extracelular. Es interesante notar que cuando la estimulación no fue específica o cuando se estimuló sin llegar a producir la potenciación, no hubo tales aumentos en la secreción de estas proteínas. Este hecho sugiere que es el desarrollo de la PLP, el factor esencial para los cambios en el metabolismo proteico observado.

En 1984 Shashoua y col. (38) mostraron que la proteína S-100 se libera al líquido extracelular, usando tres diferentes modelos:

- 1.- Líquido extracelular de cerebros perfundidos por medios isotónicos.
- 2.- Colecciones del medio de perfusión de rebanadas de tejido hipocampal.
- 3.- Por medio de muestras de LCE de la rata, mostraron que los niveles de S-100 son de 3 a 6 veces mayores que los encontrados en las fracciones citoplasmáticas solubles de los mismos tejidos.

Estas diferencias de los niveles de esta proteína en las fracciones extracelulares relativas a fracciones intracelulares indican que la S-100, una proteína ácida que constituye 0.1-0.2 % del total proteico soluble del cerebro, se libera selectivamente a los espacios extracelulares del tejido nervioso.

En otro trabajo de este mismo grupo se mostró que rebanadas de hipocampo liberan proteínas al medio de perfusión de manera continua a razón de 2 mg/mg de tejido/hora. El análisis de LDH demostró que esta liberación no es producto de lisis celular. Además se mostró que estas proteínas tienen un tiempo de vida media muy corto (aproximadamente 4 hr) y que pueden ser distinguibles de la fracción soluble citoplasmática por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Por medio de la

técnica de doble marcaje, estos autores mostraron además que las proteínas liberables parecen ser más glicosiladas que las proteínas que se quedan en el tejido y no se liberan. Estas proteínas y glicoproteínas se encuentran en el rango de los 14 y 86 kilodaltons (kdt). Es interesante que cuando las muestras se procesan con buffer sin Ca^{++} , solamente los picos de 14 y 18 kdt se distinguen en el gel. Los resultados de este experimento, son por tanto consistentes con la noción de que existe un grupo de proteínas en el hipocampo las cuales son selectivamente liberadas al líquido extracelular (39).

En otros trabajos Sandberg y col. (40, 41) estudiaron el papel del Ca^{++} en la formación y liberación de sustancias radioactivas (provenientes del transporte lento) en rebanadas de tejido cerebral (colículo superior) de conejo.

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

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

En un segundo estudio usando la misma preparación pero solo esperando que los componentes del transporte axonal rápido lleguen al colículo superior, observaron otra vez que alto K^+ produce un mayor aumento en la fracción soluble en TCA que la fracción precipitable a este tratamiento. Un resultado muy interesante fue que al quitar el Ca^{++} del medio observaron que la liberación espontánea de GABA exógeno y aminas primarias aumentaba. Este resultado sugiere que el mantener el tejido en un medio sin Ca^{++} , aumenta la permeabilidad de las membranas de células nerviosas y con ello un aumento en la liberación de diferentes moléculas que incluye a proteínas. Sin embargo ambas fracciones (solubles y precipitadas con TCA) mostraron ser dependientes de la presencia de Ca^{++} cuando se evocaba una liberación con alto K^+ . Además observaron que la presencia de Ca^{++} era fundamental para la degradación (posiblemente debido a proteinasas dependientes de Ca^{++}) de proteínas transportadas axonalmente, para dar proteínas solubles, pequeños péptidos y aminoácidos.

De los resultados de estos trabajos, se sugiere que las terminales nerviosas pueden liberar cantidades considerables de productos de degradación proteica, dependiente de actividad

sináptica y que en condiciones de concentraciones bajas de Ca^{++} , y no dependientes de la actividad, la liberación espontánea de diversas moléculas que incluye a proteínas puede llevarse a cabo representando quizás un importante medio de comunicación intercelular.

III.5 LIBERACION DE PROTEINAS EN CULTIVO DE TEJIDO NEURONAL.

En un trabajo sobre la liberación de proteínas en sistemas in vitro, K. Sweader (42) reportó la liberación espontánea de proteínas de un cultivo de neuronas simpáticas disociadas provenientes del ganglio cervical superior de ratas jóvenes. En este estudio se observó una liberación de 16 a 18 proteínas solubles que son distintas de las glicoproteínas de la membrana celular. Sweader demostró además que esta liberación es independiente de la liberación del neurotransmisor y la liberación se lleva a cabo por la región distal del axón y probablemente también del cuerpo celular y de las dendritas.

Gracias a que estudios in vitro permiten el control preciso de las condiciones experimentales, Sweader realizó una serie de controles para eliminar el posible origen artefactual de las proteínas. Así por ejemplo, cuando se incubaron las células con 100 μM de cicloheximida, no hubo incorporación de 3H -leucina con lo que se infiere que las proteínas son realmente sintetizadas por las células. Cuando se comparó el patrón electroforético de estas

proteínas liberadas con el patrón de proteínas de suero de rata, de lisis celular, y también de fracciones membranales crudas o parcialmente purificadas, se mostró que eran diferentes. Además, se pudo verificar que el patrón electroforético de estas proteínas liberadas no varió al incubar las células con inhibidores de proteasas con lo que se infiere que estas proteínas no son producto de degradación proteolítica. Además, este dato queda corroborado por el hecho de que cuando se intentó repetir o acelerar la liberación espontánea de proteínas con 1-100 mg/ml de tripsina, quimotripsina, papaina, pronasa, fisina y colagenasa, nunca se obtuvo éxito.

Ya que estas proteínas liberables se marcaron cuando se incubaron las neuronas con 3H-fucosa o glucosamida, se infiere también que éstas son glicoproteínas. Cuando se probaron una serie de manipulaciones que se sabe producen una disminución de la liberación de neurotransmisores, tales como omitir el Ca^{++} o agregar Mg^{++} ó Co^{++} , no se modificó significativamente el patrón ni la cantidad de proteínas liberadas. Cuando se usaron manipulaciones que producen un aumento en la liberación del neurotransmisor como la incubación en un medio de alto K^{+} (54 mM) se observó que las proteínas liberables aumentaron, resultado que no fue significativo, comparado con el aumento de 3H-norepinefrina. Sin embargo, al usar la neurotóxina (veneno de la araña viuda negra), la cual induce específicamente una exocitosis masiva de las vesículas sinápticas, un nuevo grupo de proteínas liberadas apareció en el medio de cultivo. Este hecho ocurrió independientemente si el cultivo era colinérgico o

adrenérgico.

Un dato importante es que en ausencia de Ca^{++} se puede evocar la liberación del neurotransmisor pero no la de estas proteínas. Esto sugiere por tanto, que la liberación de proteínas no es un paso esencial en la liberación del neurotransmisor, pero puede acompañarlo.

Con el objeto de definir la relación de estas proteínas liberables con la liberación de neurotransmisores, se realizaron una serie de manipulaciones depolarizantes (46), las cuales mostraron que:

- 1.- La depolarización de neuronas con 54 mM de K^+ aceleró la liberación del neurotransmisor pero no produjo liberación detectable de proteína en el medio de cultivo.
- 2.- Al sustituir Ba^{++} por Ca^{++} en el medio con alto K^+ no solo se produjo una mayor liberación del neurotransmisor, sino que además ya se detectaron las proteínas liberadas.
- 3.- Veratridina, una tóxica que depolariza las células abriendo canales de Na^+ sensibles a voltaje, también produjo una liberación rápida del neurotransmisor y la liberación de proteínas.
- 4.- Tetrodoxina, que bloquea los canales de Na^+ sensibles a voltaje, antagoniza los efectos de la veratridina.

- 5.- El ionóforo A23187 que tiene una alta selectividad por Ca^{++} también evoca la liberación del neurotransmisor y proteínas. Sin embargo, este efecto fue bloqueado por Co^{++} , un antagonista de Ca^{++} .
- 6.- En ausencia de Ca^{++} y en presencia del veneno de la araña viuda negra, pCMBs (ácido sulfónico para cloro mercuri benceno) ó A23187 no se pudo detectar proteínas liberadas.
- 7.- La adición de Ca^{++} después de una hora de haber agregado el veneno de la araña viuda negra, ó pCMBs produjo una liberación tardía de proteínas.
- 8.- Co^{++} que actúa como agonista o antagonista de Ca^{++} en distintos sistemas, bloquea la liberación de proteínas a concentraciones de 5 mM incluso en un medio de pCMBs.

De las evidencias antes mencionadas y otras, resulta claro que existe una separación entre la liberación de proteínas y del neurotransmisor y esto, en base a que la liberación del neurotransmisor no siempre necesita Ca^{++} , en cambio las proteínas no se liberan sin Ca^{++} en el medio de cultivo.

Swadner también discute algunas hipótesis en relación al mecanismo de la liberación proteica. Así la hipótesis más simple es que las proteínas son liberadas de la superficie celular simplemente por un proceso de proteólisis limitada. Por ejemplo, y asumiendo que las proteínas están unidas a la membrana por su

región hidrofóbica, la liberación podría ser trabajo de una proteasa dependiente de Ca^{++} o de algún proceso proteolítico activado por Ca^{++} (43).

Quizás la recaptura de las membranas vesiculares, que se unieron a la membrana plasmática durante la exocitosis podría requerir la modificación de proteínas de la superficie celular. El reciclaje vesicular ha sido estudiado bastante en detalle (44) y parece que al menos existen dos mecanismos para este reciclaje. Uno que se llevaría a cabo a niveles de estimulación bajos en el cual las vesículas sinápticas serían recapturadas y recicladas como vesículas pequeñas, sin que ocurra en este proceso algún cambio morfológico importante. El otro que se llevaría a cabo a altos niveles de estimulación, produciría que pedazos grandes de membranas se introdujeran formando cisternas intracelulares, las cuales serían degradadas o recicladas a vacuolas sinápticas. Ceccarelli y Hurlbut, demostraron en 1980 (45) que la recaptura de la membrana requiere de Ca^{++} extracelular en la unión neuromuscular tratada con niveles bajos del veneno de la araña viuda negra. Además, Ba^{++} aumenta la liberación del neurotransmisor incrementando la recuperación de las membranas por vacuolas y La^{+++} a altas concentraciones produce la liberación del neurotransmisor y bloquea la recuperación de la membrana. Todos los efectos mostrados son paralelos a los efectos observados sobre la liberación de proteínas. Así, los efectos del calcio y sus análogos, sugieren una buena correlación entre la liberación de proteínas de la superficie celular y la recaptura membranar en vacuolas o cisternas.

En un artículo posterior, Sweadner (46), profundizó más en sus investigaciones sobre estas proteínas liberables y demostró que estas proteínas se liberan al medio en forma de monómeros solubles. A través de un análisis hidrodinámico se indicó que estas proteínas no tienen forma globular, sino probablemente fibrilar.

III.6 LIBERACION DE PROTEINAS EN SISTEMAS IN VIVO.

En una serie de estudios sobre la liberación de proteínas in vivo (47, 48) se mostró la existencia de una liberación continua de proteínas cerebrales hacia el LCE por medio de la perfusión ventrículo-cisternal en conejos no anestesiados. Los autores mostraron que los niveles de proteínas de los perfusados se mantenían "relativamente" constantes durante las 6 horas de perfusión. La concentración media de proteínas totales de las muestras de perfusados de animales no anestesiados y sin tratamiento farmacológico fue de 780 +/- 97 ug/ml. Más de un 85 % de estas proteínas resultaron ser mayores de 50 kdt. Cuando los animales fueron tratados con pentobarbital la concentración de estas proteínas bajo a 266 ug/ml correspondientes a una disminución del 60 %. Aún más, cuando los animales fueron tratados con haloperidol, los niveles llegaron a 166 +/- 38 ug/ml que representa un 70 % menor de los niveles en animales sin tratamiento farmacológico. El resultado de los efectos de la administración de pentobarbital, sobre los niveles de proteínas de

los perfusados del LCE esta en completa concordancia con los resultados de Drucker-Colin y col. (49), los cuales mostraron una rápida disminución de los niveles proteicos de perfusados, después de la administración de pentobarbital sódico.

Basado en lo anterior Barkai, y en conocimiento del importante papel que la serotonina (5-HT), parece tener en la regulación del ciclo sueño-vigilia, decidió investigar la relación entre el recambio de 5-HT, el cual fue estimado por un método que combinó la perfusión ventrículo-cisternal con la dilución del isótopo (5-14C-HIIA) que permite simultáneamente estimar la dinámica de aparición y desaparición de (5-HIIA) en el LCE. Los resultados de este experimento mostraron que existe una relación lineal positiva con una $r = 0.71$ entre el metabolismo de 5-HT y la secreción de proteínas al LCE.

Otro de los trabajos importantes sobre la liberación de proteínas in vivo fue llevado a cabo por Greenfield y col. en 1983 (50), quienes publicaron un importante trabajo sobre la liberación de proteínas totales, acetilcolinesterasa y colinesterasa no específica en gatos anestesiados. El estudio de la liberación de proteínas se realizó utilizando las cánulas de inyección-extracción ("push-pull").

Primero analizaron las liberaciones espontáneas de estas proteínas y mostraron que tanto los niveles de acetilcolinesterasa, colinesterasa no específica y proteína total liberada de los núcleos caudados no difieren significativamente de

los niveles obtenidos en sustancia nigra. En segundo termino observaron que la omisión de Ca^{++} del medio de perfusión, no produjo ningún efecto significativo sobre los patrones de liberación espontánea de estas proteínas.

En base a las actividades de las enzimas colectadas en los perfusados hicieron una estimación de las concentraciones y obtuvieron que la acetilcolinesterasa podría representar solo el 0.0015 - 0.0038 % del total proteico recolectado. Cuando se le suman las otras dos proteínas (colinesterasa no específica y LDH) estos valores llegan a representar solo un 0.02 - 0.05 % de la proteína total liberada.

También estudiaron el efecto del alto K^+ (30 mM) sobre la liberación de estas proteínas y mostraron que tanto la proteína total como acetilcolinesterasa aumentaron en un 103 y 64 % respectivamente, sobre los niveles basales. Los niveles de colinesterasa no específica y LDH no cambiaron producto de esta manipulación. Cuando se omitió el Ca^{++} en estas estimulaciones con alto K^+ , se observó que el aumento de liberación de acetilcolinesterasa fue totalmente abolido, en cambio para las proteínas totales la abolición fue solo parcial. Cuando se usó 100 mM de K^+ , se observó que el aumento de liberación de acetilcolinesterasa y proteínas totales tampoco cambiaron (en comparación con 30 mM) aunque el aumento de acetilcolinesterasa fue más prolongado (se mantuvo en un mayor número de colecciones).

Los interesantes resultados obtenidos en este estudio sugieren que:

- 1.- La liberación de algunas proteínas del sistema nervioso central ocurre de manera espontánea.
- 2.- La manipulación por medio de factores despolarizantes produce la liberación de algunas pero no de otras proteínas de este sistema. Este hecho sugiere que existen cuando menos dos poblaciones de proteínas liberables distintas del sistema nervioso. Un grupo que incluiría a proteínas liberadas dependiendo de la actividad neuronal y otro grupo cuya liberación parece ser independiente de la actividad nerviosa.
- 3.- Ya que en este estudio la omisión de Ca^{++} no afectó notablemente la liberación espontánea de proteínas y considerando que en esta misma preparación se ha demostrado una dependencia de Ca^{++} para la liberación espontánea de neurotransmisores (51) sugiere que los mecanismos de liberación espontánea de proteínas y de neurotransmisores son diferentes.
- 4.- Los efectos del Ca^{++} en la liberación evocada de acetilcolinesterasa de la sustancia nigra, sugiere fuertemente que el origen de esta enzima es neuronal. Por otro lado ya que la estimulación con K^+ en ausencia de Ca^{++} no produjo que los niveles de proteínas totales llegaran a valores significativos, sugiere que existen cuando menos dos

poblaciones proteicas que se liberan de células nerviosas por estimulación despolarizante; una dependiente y otra independiente de la presencia de Ca^{++} para su liberación.

- 5.- Por otra parte resulta claro que no todas las proteínas liberadas tienen un origen neuronal. Aunque a la fecha no se conoce la identidad celular de otras proteínas, existe la posibilidad de que contaminación con material no proteico incrementaran de manera artificial los valores proteicos totales de los perfusados.

Resulta también evidente que la identificación de estas proteínas permitirá resolver muchas dudas en relación al origen de las mismas.

En otro trabajo posterior al de Greenfield, Bayón y col. (52) desarrollaron un sistema de perfusión intracerebral in vivo similar al de Greenfield, pero utilizando una cánula de perfusión distinta. El modelo de cánula utilizado por Greenfield, así como por otros investigadores, es el diseño clásico desarrollado por Gaddum (53), en donde la aguja de infusión sobrepasa el nivel de la aguja de extracción (aprox 2 mm) lo cual va a propiciar que tanto la aguja de infusión como la de extracción se obturen continuamente con pedazos de tejido, alterando el curso de la perfusión o bien causando una lesión considerable al tejido. El nuevo diseño de cánula propuesto por Bayón consiste primordialmente en la modificación de la punta de la cánula. Dicho cambio radica en la protección de la aguja de infusión por la

aguja externa, desarrollando así una cánula ranurada (para más detalle ver "canula" en esta misma sección).

El empleo de este nuevo tipo de cánula hizo posible en un primer punto comparar los dos tipos de cánulas (tradicional y ranurada), observando que el número de obstrucciones fue 5 veces mayor en la cánula tradicional que en la ranurada, así como también una disminución en el tiempo de sangrado por la cánula ranurada, al momento de ser insertada en el cerebro.

Otras observaciones que realizaron durante el desarrollo experimental fue la liberación de proteínas y encefalinas, como de otros marcadores (LDH, 3H-GABA) que utilizaron para monitorear la lesión en el tejido y la viabilidad del mismo.

La liberación de proteínas y encefalinas se caracterizó por los siguientes eventos:

- 1.- Al insertar la cánula observaron un aumento, tanto de proteínas como de encefalinas. Esto lo explican como un efecto de la lesión en el tejido al momento de la inserción de la cánula, ya que se presenta sangrado y destrucción celular.
- 2.- Una vez que se lavó el tejido con el líquido de perfusión se observa una liberación continua, tanto de proteínas como de encefalinas, lo cual les permitió establecer una línea base que permite conocer la liberación en condiciones normales de

dichos metabolitos.

- 3.- Al aplicar un agente despolarizante (K^+ 50 mM) observaron un aumento significativo en la liberación de proteínas y encefalinas, el cual fue decreciendo gradualmente hasta alcanzar de nuevo la línea base.
- 4.- Al producir una lesión mecánica al final de la perfusión observaron un aumento considerable tanto en la liberación de proteínas como de encefalinas. Esta lesión producida al final, la hicieron con el fin de establecer un control que les permitiera visualizar una liberación másiva de proteínas y encefalinas, y con el fin de tener un patrón de comparación que les permita diferenciar la línea basal de una forma significativa.

Este grupo de trabajo reportó también la utilización de 3H-GABA como un marcador de la viabilidad del tejido, ya que al ser un neurotransmisor que se encuentra en las terminales nerviosas y se libera por las mismas en condiciones fisiológicas, les permitirá visualizar si el tejido se encontraba funcionando adecuadamente o si bien la liberación de proteínas se debió a artefactos durante la perfusión.

Junto con lo anterior también cuantificaron la liberación de deshidrogenasa láctica (DHL), una enzima citoplasmática soluble, que se va a liberar solamente en presencia de lisis celular. La cuantificación de esta enzima les permitió descartar la

posibilidad de que la proteína liberada fuera producto de la lisis celular. Observaron que dicha enzima aumentaba considerablemente al inicio de la perfusión, cuando se producía la lesión al introducir la cánula y al final de la misma al momento de producir la lesión mecánica, y no durante la perfusión ni al momento de producir una liberación por despolarización con un agente químico.

De acuerdo con lo anterior cabe hacer mención de la importancia de poder conocer mejor estas proteínas que se liberan tanto en condiciones normales como al presentarse una despolarización, ya que podrían jugar un papel importante en los procesos de transmisión de la información nerviosa, de hecho algunos autores no descartan la posibilidad de que desempeñen algún papel como posibles neuromoduladores pero aún no se tienen las evidencias suficientes como para poder hacer la aseveración anterior. En este contexto consideramos más importante el conocer las características generales de estas proteínas, como puede ser el contar con las técnicas adecuadas para su detección y cuantificación, así como su distribución en el sistema nervioso central, para posteriormente intentar su aislamiento y posiblemente su caracterización.

III.7 CANULAS.

Para la realización de perfusiones intracerebrales se han utilizado diferentes tipos de cánulas. En 1953 Feldberg y Sherwood

(54) describen la cánula de collison (la cual se atornilla directamente al cráneo del animal), que consiste en una aguja que se puede conectar directamente a una jeringa con solución salina fisiológica o con una solución de la droga que será inyectada, este tipo de cánula la utilizaron principalmente para perfusiones intraventriculares (55). Posteriormente, Fox y Hilton (56) en 1958 diseñaron un sistema de dos agujas paralelas que utilizaban para intercambiar el medio de perfusión a través del tejido subcutaneo (57). En noviembre de 1960 en el encuentro de Mill Hill de la sociedad de Fisiología, Gaddum (53) describe una serie de modificaciones que realizó a la cánula de Fox y Hilton, siendo la principal que colocó las dos cánulas concéntricamente (una dentro de la otra) para asegurar aún más la precisión de la zona a perfundir, y reportando en 1961 (58) la primera observación de la liberación de acetilcolina (ACh) con este método, todo esto de una estructura subcortical específica como es el núcleo caudado. A este diseño se le conoció como cánula "push-pull", ya que facilitó la inyección-extracción de una solución fisiológica artificial en el parenquima cerebral.

Este nuevo método trajo consigo una serie de ventajas:

- 1.- Facilita la recolección de sustancias liberadas en condiciones normales.
- 2.- Nos da indicaciones bastante claras sobre el intercambio del material almacenado y puede ser utilizada para estudiar los factores de la estimulación nerviosa.

- 3.- Esta técnica hace posible localizar el sitio de la liberación de sustancias en tejidos como el sistema nervioso central, más precisamente que por otras técnicas (59).

- 4.- Con esta técnica se puede visualizar fácilmente alguna posible contaminación producida por la interacción con la barrera hémato-encefálica.

En 1964 Delgado y col. (60) proponen el uso de la cánula yuxtapuesta, similar al diseño de Fox y Hilton, que consiste en dos tubos de acero inoxidable calibre 27 y que están soldados uno al otro paralelamente y unidas a dos electrodos, designando a este nuevo diseño como quimiotrodos (61), ya que permiten el uso de la cánula "push-pull" y al mismo tiempo la estimulación eléctrica. Este diseño trajo consigo la facilidad de que la cánula pueda ser utilizada repetidas veces en el mismo animal y en la misma zona por varias semanas, debido a que la cánula era implantada permanentemente al cráneo del animal.

En 1969 Myers y Sharp (62) presentan el método de la implantación permanente de la cánula de extracción en el hipotálamo de monos. Aunque este método de implantación del tubo externo de la cánula reduce el trauma local del tejido, se presentan dos problemas: (i) la oclusión de la punta de la cánula debido a material de la neuroglía y (ii) disminución de las neuronas reactivas en la región alrededor del sitio de perfusión a consecuencia de la encapsulación por tejido cicatrizante.

Como una posible solución a este problema Barton y col. (63) proponen en el mismo año el uso de cánulas guías implantadas crónicamente (por medio de cemento acrílico) en la cisterna magna de ovejas, permitiendo que con esto los animales se puedan recuperar de la cirugía de implantación y la inserción de la cánula sea en forma aguda, encontrándose la zona a perfundir sin lesión alguna.

En la actualidad, el modelo de cánula que se utiliza en las perfusiones cerebrales, es basicamente el descrito por Gaddum (53) y adaptado por Myers (64)(figura 1).

En trabajos anteriores con este tipo de cánula se observó que durante la perfusión había una alta insidencia de obstrucciones en el flujo, debidas principalmente a fragmentos de tejido y/o pequeños coágulos , esto a causa de la erosión del tejido por el flujo del líquido de perfusión. Con el fin de disminuir dicha erosión se diseñaron modelos en los cuales la punta de la cánula de infusión se encontraba dentro de la cánula de extracción (65).

Sin embargo este modelo no llega a ser el ideal, ya que la interfase de difusión en la punta de la cánula y el área del tejido a perfundir se reduce, siendo necesario el uso de cánulas de mayores dimensiones, lo que disminuye su utilidad para la perfusión de animales pequeños.

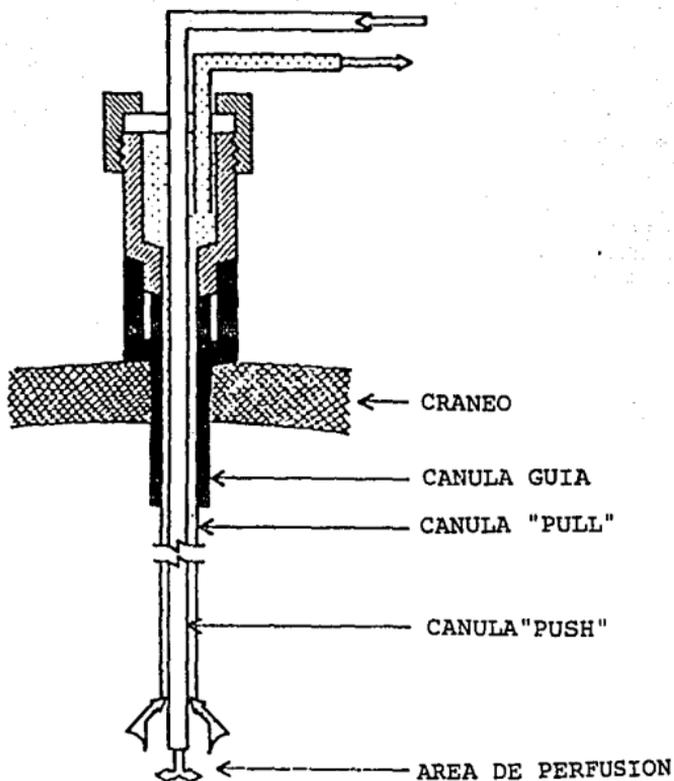


FIGURA 1. Modelo de la cánula "push-pull" desarrollado por Gaddum y adaptado por Myers, en donde la cánula de inyección está directamente en contacto con el tejido y la de extracción por encima de la de inyección (78).

Partiendo de las experiencias anteriores Bayón y col. (66, 67) modificaron la geometría de la sonda de perfusión en el extremo que esta en contacto con el tejido. La cánula prototipo se construyó a partir de tubos de acero inoxidable de pared delgada calibre 27 (interna o "push") y 21 (externa o "pull"), antes de ensamblarlas uno de los extremos de la cánula externa se ocluye con soldadura y se ranura bajo control microscópico. La nueva disposición geométrica de la sonda, hace que la ruta de circulación del líquido de perfusión sea paralela a la superficie expuesta del tejido, reduciendo de esta manera la resistencia tisular y del sistema de perfusión. El número y la longitud de las ranuras (área de contacto tejido-medio) son susceptibles de variaciones dependiendo de la anatomía y el tamaño del área cerebral que se quiera perfundir (figura 2).

Desde sus primeros diseños la cánula "push-pull" ha sido utilizada para diferentes propósitos, aquí se mencionan algunos de los más importantes:

- 1.- Facilita la perfusión de los ventrículos cerebrales con drogas, o para determinar la liberación de compuestos endógenos o marcados en el líquido cerebroespinal (68).
- 2.- Para perfundir distintas áreas del cerebro con drogas y estudiar su efecto sobre las funciones del sistema nervioso central u órganos periféricos (69). Además el área de perfusión puede ser estimulada eléctricamente con la punta de la cánula y así poder investigar los efectos de las drogas

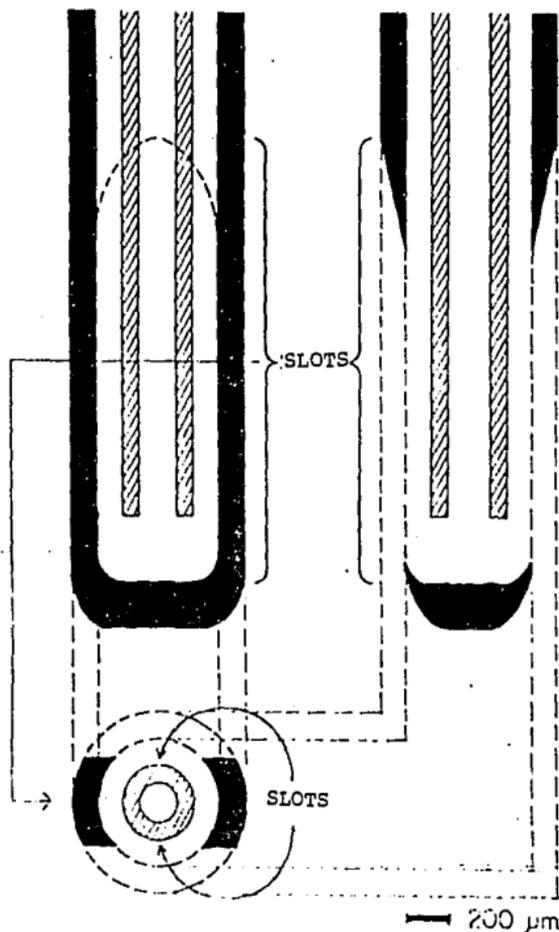


FIGURA 2. Proyección ortogonal de la punta de la cánula "push-pull" desarrollada por Bayón y col., como se observa, la cánula "push" se encuentra protegida por la cánula "pull" y la zona de perfusión se va a restringir al contacto que haya entre el líquido y el tejido a través de los "slots" de la cánula (52).

sobre los cambios en la presión sanguínea evocados por la estimulación del área perfundida (65, 70). Es obvio que la perfusión de distintas áreas del cerebro con agonistas o antagonistas específicos puede ayudar a aclarar la naturaleza bioquímica del sistema nervioso, involucrado en procesos de conducta y en la regulación de funciones de órganos periféricos. La cánula "push-pull" también ha sido utilizada para registrar actividad eléctrica en el área de perfusión.

3.- Se ha utilizado para inyectar monoaminas marcadas (noradrenalina, dopamina o 5-hidroxitriptamina) o aminoácidos (GABA, glicina) y poder investigar el reposo y la liberación inducida de compuestos radioactivos y sus metabolitos (65, 71, 72). Con esta técnica los efectos de las drogas y de la estimulación eléctrica en la liberación de compuestos marcados ha sido minuciosamente investigada. Sin embargo, debemos de conservar en mente que los neurotransmisores marcados que se han inyectado son almacenados y pueden ser liberados por células neuronales o células no neuronales.

4.- Para perfundir distintas áreas del cerebro con precursores de neurotransmisores como 3H-tirosina (73), 3H-triptofano o 3H-glutamina y determinar los patrones de liberación de catecolaminas marcadas (dopamina, noradrenalina) recientemente sintetizadas, así como 5-hidroxitriptamina y GABA (74).

- 5.- Para perfundir distintas áreas del cerebro de animales anestesiados y concientes y determinar la liberación de neurotransmisores endógenos en los perfusados. En un principio se utilizaron bioensayos y técnicas fluorométricas para la determinación de acetilcolina (60, 75), dopamina (76) y 5-hidroxitriptamina (77).

VENTAJAS DE LA CANULA "PUSH-PULL".

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

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

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

Estas ventajas son solo algunas, evidentemente existen muchas otras, pero con lo ya mencionado queda claro, el enorme potencial de su uso en las neurociencias, y en otras áreas como pueden ser la fisiología y la farmacología.

DESVENTAJAS DE LA CANULA "PUSH-PULL".

Desgraciadamente esta técnica también presenta algunas desventajas que son importantes mencionar:

- 1.- La introducción de la cánula produce un daño celular que en algunos casos puede ser importante, pero que en otros no parece ser mayor que el producido por la introducción de un electrodo.
- 2.- Es difícil evaluar la cinética de la desaparición de una sustancia introducida al sistema nervioso por medio de este método.
- 3.- Así mismo, es difícil calcular la concentración de una sustancia una vez infundida en el tejido y poder determinar con exactitud el área de la zona perfundida.
- 4.- Es evidente que este sistema no permite estudiar eventos bioquímicos que ocurren muy rápido y por lo tanto los cambios fásicos en la liberación de una sustancia son muy difíciles de percibir.

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

III.8 PERFUSIONES.

Los métodos de perfusión que se emplean en la actualidad están basados en el mismo principio: el control de la inyección y la extracción de un fluido fisiológico artificial que baña células, tejidos u órganos. Este procedimiento permite la colección continua de los productos que liberan las células bajo varias condiciones fisiológicas y farmacológicas. De acuerdo con la aplicación de los sistemas de perfusión los podemos clasificar como perfusiones in vitro y perfusiones in vivo.

En el estudio de los procesos de liberación in vitro a través de las técnicas de perfusión, se han utilizado principalmente tres tipos de preparaciones: sinaptosomas, rebanadas de tejido y pequeños órganos, como ganglios y pequeñas glándulas (78).

La perfusión de sinaptosomas adaptada por Raiteri (79) y Redburn (80) consiste en una cámara cerrada con un filtro microporoso donde los sinaptosomas son retenidos y empaquetados presentando una delgada capa de material a perfundir. Aunque este sistema ha sido utilizado para estudiar la liberación de transmisores clásicos, experimentos sobre la liberación de material peptídico nos permite ver una de sus limitantes: la capacidad de los filtros para retener elementos sinaptosomales sin alterar el flujo, y la estabilidad de la muestra es limitada a una pequeña cantidad de proteína sinaptosomal (aproximadamente 0.5 mg en un filtro de 25 mm de diámetro) (78).

La perfusión de fragmentos de tejido o rebanadas (o pequeños organos), es una técnica donde la cantidad de material perfundido no es tan estrictamente limitada como se mencionó anteriormente, aunque el desarrollo metodológico es muy parecido (81, 82). El tejido es puesto en una cámara entre dos rejillas, las mallas son bastante pequeñas como para retener los fragmentos de tejido, que están en un intervalo de entre 100 y 500 μm . El flujo es mantenido por dos sistemas de bombeo. Este sistema es diferente al mencionado anteriormente ya que no es un baño cerrado sino que se encuentra abierto a la presión atmosférica.

El uso continuo de las técnicas neuroquímicas *in vitro* para poder entender el papel del código químico en el cerebro nos pone al tanto de algunas de sus limitantes. El aislamiento quirúrgico de ciertas regiones del cerebro y su fraccionamiento mecánico a estructuras celulares y subcelulares facilita el control de las condiciones experimentales en las cuales será estudiado, pero como una consecuencia de este aislamiento se pierden las conexiones normales con el cerebro y con el resto del organismo. Por lo tanto, para poder estudiar la regulación fisiológica de diversos eventos neuroquímicos y su integración dentro de la función neural, es necesario abordar el problema con sistemas *in vivo*. El más obvio es crear un sistema de perfusión análogo al usado *in vitro*, pero en lugar de poner la muestra de tejido en un baño, es necesario implantar el baño en el tejido cerebral de un animal vivo (52). Desde los años 70's se han utilizado copas, agujas, cánulas concéntricas, bolsas de diálisis y fibras, todos capaces de introducir una solución fisiológica artificial en el cerebro

permitiendo la administración y el muestreo de sustancias químicas dentro y provenientes de estructuras neurales bien definidas.

La administración in vivo de alteraciones en la captación y liberación de sustancias provenientes de estructuras cerebrales profundas se ha llevado a cabo tradicionalmente por el método de perfusión ventricular ya descrito por Leusen (83), Battachayra y Feldberg (84) y Pappenheimer y col. (85).

Las cánulas ventriculares son implantadas en regiones separadas del sistema ventricular cerebral, funcionando una para la infusión y otra para extraer el líquido cerebroespinal que se encuentra en la cavidad entre ambas cánulas. Otra herramienta de perfusión ya utilizada es la llamada copa cortical, la cual es una cámara que se adhiere crónicamente a la superficie del cerebro y cuenta con tuberías que permiten la infusión y la extracción del líquido de perfusión (64).

La principal desventaja de estas técnicas es sin embargo, la imposibilidad de usarlas para examinar regiones cerebrales discretas localizadas a alguna distancia del lumen ventricular o la corteza cerebral. En estas circunstancias la técnica de perfusión con cánulas "push-pull", originalmente descrita por Gaddum (53, 58) representa un importante avance. Esta técnica utiliza una cánula concéntrica cuya principal ventaja sobre los sistemas de perfusión descritos antes, es la posibilidad de perfundir estructuras específicas del parénquima cerebral (sin importar su profundidad).

Ya desde su primera descripción numerosos investigadores han empleado este método para estudiar la liberación de posibles neurotransmisores tales como la acetilcolina (ACh) (86), noradrenalina (NA) (87) y 5-hidroxitriptamina (77).

Probablemente la principal ventaja de trabajar con un sistema "push-pull" radica en la versatilidad de la técnica, la cual puede ser usada para varios propósitos experimentales. El uso de la cánula "push-pull" para la recolección de neurotransmisores endógenos en los perfusados abre una nueva perspectiva en el estudio de la dinámica de la liberación de neurotransmisores en distintas áreas del cerebro (59) (figura 3).

Conjuntando las técnicas de perfusión con los métodos adecuados para detectar la liberación de neurotransmisores endógenos en los perfusados nos dan la opción de poder investigar:

- 1.- El patrón de liberación de neurotransmisores endógenos en estructuras del parénquima cerebral.
- 2.- Cambios en la proporción de liberación de neurotransmisores producidos por estimulación eléctrica (88, 89).
- 3.- Los efectos de agonistas y antagonistas de receptores en la liberación de neurotransmisores endógenos. Así, procesos como la regulación de la liberación de neurotransmisores puede ser estudiada bajo condiciones in vivo (90).

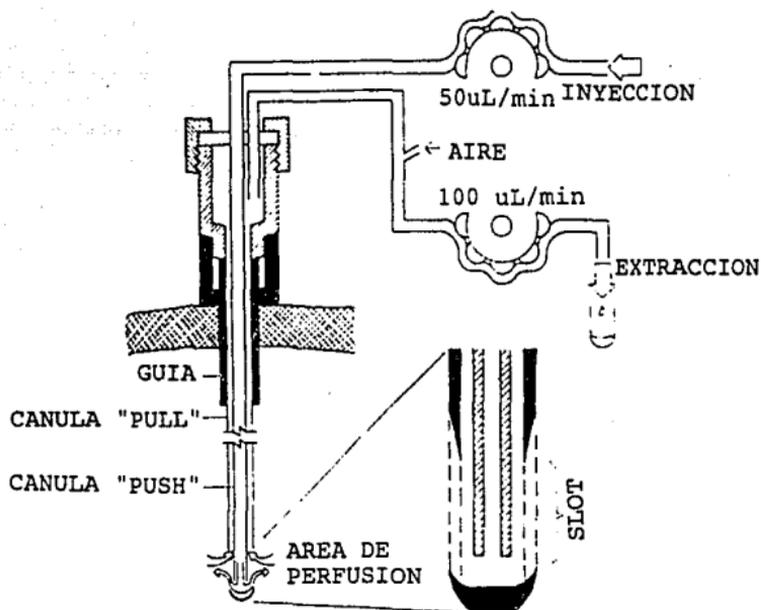


FIGURA 3. Sistema de perfusión "push-pull". La cánula es adaptada a un sistema de bombas peristálticas que se van a encargar de inyectar y extraer el líquido de perfusión. Los flujos de inyección y extracción se mantienen constantes durante toda la perfusión, la diferencia entre ambos flujos es compensada por una entrada de aire en la tubería de extracción (52).

- 4.- La influencia de cambios conductuales, o la alteración de la función de órganos periféricos, sobre los patrones de liberación de neurotransmisores.

- 5.- Alteraciones en la proporción de liberación de neurotransmisores en distintas áreas del cerebro como una consecuencia de cambios en las funciones centrales, que puede ser útil para esclarecer el papel de los neurotransmisores de esta área en particular en los procesos regulatorios (91, 92).

A pesar del uso relativamente amplio de la técnica de perfusión in vivo, se le ha dado poca atención a las variables que influyen en la eficiencia del sistema de perfusión. En las dos últimas décadas solo Myers (64), Yash y Yamamura (93), Honchar (94) y Bayón (66) han revisado la teoría y la práctica de la técnica de perfusión in vivo, los objetivos de estas revisiones se pueden traducir como intentos de solucionar los principales problemas técnicos de los métodos de perfusión.

Dentro de los principales problemas que se pueden presentar en una perfusión se encuentran: a) lesiones del tejido producidas por el sistema de perfusión; b) erosión del tejido por el constante flujo del líquido de perfusión; y c) accidentes hidrodinámicos.

Las lesiones del tejido son producidas principalmente al introducir la cánula, lo que puede propiciar que haya una parcial

o total interrupción del flujo al bloquearse el sistema de inyección o extracción con pedazos de tejido y/o con pequeños coágulos, esto también puede ocurrir a lo largo de la perfusión si se llega a presentar un daño tisular mecánico a causa de algún movimiento brusco del animal (66).

La erosión del tejido causada por el flujo constante del líquido de perfusión se puede ver favorecida si se aumenta la velocidad del flujo, propiciando que se deteriore la funcionalidad del tejido e incluso que se pueda presentar desprendimiento de pequeños fragmentos de tejido que pueden obturar los sistemas de inyección-extracción y por lo tanto favorecer el acumulo de líquido en la zona de perfusión, o bien generar una presión negativa con el consecuente daño en el tejido. Otro de los problemas que se pueden presentar es el sangrado continuo debido a la erosión producida cerca de un vaso sanguíneo, encontrándose los perfusados contaminados con material proveniente de la sangre, muchas veces este tipo de contaminaciones no son visibles en condiciones normales, sin embargo interfieren significativamente en las determinaciones que se realizan a los perfusados.

Por último los accidentes hidrodinámicos se presentan cuando no hay una buena sincronización entre el sistema de inyección y el de extracción, si alguno de los dos se llega a desfasar puede ocurrir que: a) haya una acumulación continua de líquido y este ocasione daño en el tejido; y b) que al no llegar cantidad suficiente de líquido a la zona de perfusión el sistema de extracción empiece a ejercer una presión negativa sobre el tejido,

que puede favorecer el sangrado y el daño tisular y por lo tanto obstrucciones en el flujo de extracción (95). Como una posible solución a este problema se creó un sistema de perfusión abierto (78), para que en el momento que se presente un retraso en la inyección del líquido el sistema pueda compensar con aire el líquido faltante y así evitar que se origine una presión negativa en el área de perfusión.

VENTAJAS DEL SISTEMA DE PERFUSION "PUSH-PULL".

La perfusión de regiones específicas del cerebro con la técnica "push-pull" ha sido de gran ayuda a las neurociencias en las dos últimas décadas, para poder establecer patrones de liberación y así entender mejor el papel que desempeñan los neurotransmisores en las distintas estructuras del cerebro, aquí se mencionan algunas de las ventajas:

- 1.- El utilizar animales concientes y en libre movimiento es una de las principales atribuciones de esta técnica a la investigación de los procesos de liberación, pudiendo relacionarlos a su vez con fenómenos conductuales o de comportamiento.
- 2.- Poder perfundir cualquier estructura del parénquima cerebral, independientemente de su localización.

- 3.- Permite el análisis repetitivo de neurotransmisores endógenos liberados por largos periodos de tiempo (horas) en un mismo animal.
- 4.- Permite hacer una correlación de la liberación de neurotransmisores con cambios fisiológicos.
- 5.- Facilita la exposición, por tiempos prolongados, de diversas drogas en el tejido nervioso.
- 6.- Permite la localización neuroanatómica de la acción de neuropéptidos en diversas áreas del cerebro.
- 7.- Su fácil conjunción con otras técnicas (voltametría).

Como se puede observar la versatilidad de esta técnica es su principal ventaja y ofrece un gran potencial para estudios futuros en materia de liberación e inyección de sustancias neuroactivas en el sistema nervioso central.

DESVENTAJAS DEL SISTEMA DE PERFUSION "PUSH-PULL".

Desafortunadamente esta técnica cuenta con una serie de limitantes o desventajas que hacen que muchos investigadores actuen con reserva en cuanto a su uso:

- 1.- Debido a que es una técnica invasiva, produce una lesión tisular que en algunas ocasiones puede producir patrones erróneos de liberación, y no se puede saber hasta no estar terminada la perfusión y examinar histológicamente la zona perfundida.
- 2.- Su uso se puede encontrar limitado por el tamaño de la estructura a perfundir siendo sumamente difícil perfundir zonas muy pequeñas.
- 3.- La eficiencia del intercambio de sustancias entre el líquido de perfusión y el tejido es baja.
- 4.- Puede producir alteraciones en las características del sitio de perfusión (proliferación de células no neuronales).
- 5.- Formación de cavidades en el sitio de perfusión, debido principalmente a las altas velocidades del flujo.
- 6.- Se puede ver comprometida con la barrera hémato-encefálica, y por lo tanto se pueden encontrar contaminados los perfusados.

Con lo expuesto anteriormente se puede ver que esta técnica no llega a ser la ideal para poder estudiar la liberación in vivo, pero hasta el momento es bastante adecuada para abordar este campo de estudio.

III.9 ENSAYO INMUNOADSORBENTE RELACIONADO A ENZIMAS (ELISA).

El empleo de los inmunoensayos rápidamente ha reemplazado otros métodos usados para detectar o cuantificar sustancias con propiedades fisiológicas o farmacológicas importantes. Los altos niveles de sensibilidad y especificidad alcanzados con los inmunoensayos, resultan de la unión específica, de alta afinidad y reversible de los antígenos a los anticuerpos, así como a la existencia de métodos con un grado de sensibilidad mayor en su detección a marcadores tales como isótopos, radicales libres, bacteriofagos, enzimas, etc. que se unen a antígenos o anticuerpos. Aunque los isótopos son la marca más común y extensamente usada, el número de inmunoensayos sensibles y específicos que emplean enzimas están aumentando rápidamente (101).

De entre las primeras aplicaciones de enzimas como marca o etiquetas fué el uso de conjugados enzima-anticuerpo para detectar y localizar componentes antígenicos de la célula ya sea por microscopía de luz o electrónica. Poco después, el uso de conjugados enzima-antígeno y enzima-anticuerpo en los inmunoensayos fue reportado por Engvall y Perlmann (102).

Los ensayos inmunoenzimáticos son clasificados en dos grupos: (1) los heterogéneos, en los cuales la enzima marcada, unida al antígeno o al anticuerpo es separada del complejo antígeno-anticuerpo, marcado con la enzima, antes de medir la actividad enzimática, y (2) el homogéneo, en el cual la actividad

de la enzima o antígeno marcado se mide en presencia del complejo antígeno-anticuerpo en donde dicha enzima es inhibida por efectos estericos, siendo esta una cuantificación indirecta de la unión antígeno-anticuerpo.

El ensayo inmunoabsorbente relacionado a enzimas (ELISA) es un ensayo inmunoenzimático heterogeneo que se basa en los mismos principios que los radioinmunoensayos (RIA), la mayor diferencia entre el ELISA y el RIA es el uso de una enzima para marcar el antígeno o anticuerpo en vez de utilizar un isótopo. El ensayo de ELISA se basa principalmente en la adsorción del antígeno o anticuerpo a un soporte y una vez unido se pone en contacto con el anticuerpo o antígeno (según sea el caso) que estará marcado con una enzima, después del lavado de la porción que no se unió se medira la actividad enzimática en la fracción unida por medio de la conversión, catalizada por enzima, de un compuesto acromático en un producto altamente cromático, siendo la cantidad de color desarrollada directamente proporcional a la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo presente en la reacción (99).

IV. OBJETIVO GENERAL.

DETECTAR LA LIBERACION DE PROTEINAS, EN CONDICIONES BASALES Y DE ESTIMULACION, EN PERFUSADOS "IN VIVO" DEL COMPLEJO ESTRIADO DEL CEREBRO DE RATA, EMPLEANDO METODOS BIOQUIMICOS E INMUNOENZIMATICOS.

V. OBJETIVOS PARTICULARES.

OBTENER PERFUSADOS "IN VIVO" DEL COMPLEJO ESTRIADO DEL CEREBRO DE RATA.

EMPLEAR UN ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA) PARA EVALUAR LA CONTAMINACION DE PROTEINAS SERICAS EN LOS PERFUSADOS.

DETECTAR LA LIBERACION DE PROTEINAS EN PERFUSIONES "IN VIVO" EMPLEANDO METODOS BIOQUIMICOS.

DETECTAR LA LIBERACION DE PROTEINAS EN PERFUSIONES "IN VIVO" EMPLEANDO UN ENSAYO INMUNOENZIMATICO.

VI. MATERIALES Y REACTIVOS.

Las cánulas fueron adquiridas comercialmente de Gelman Inc. No. de Cat. C313GP, C313ICP, C313DC, Houston, Texas.

El anestésico que se empleó fué halotano, Fluotane de ICI Farmacéutica, para su administración se utilizó una vaporizador anestésico Halothan Vapor 19.1, Drägerwerk ag Lübeck, Germany.

Para el transporte del líquido de perfusión a la cánula se utilizaron tuberías de silicón Sylastic, "push" tubería con un DI de 0.8 mm y DE de 2.4 mm, "pull" tubería con un DI de 1.6 mm y DE de 3.2 mm, Cole-Parmer No. Cat. N-06408-60 y N-06408-62 respectivamente.

Para la inyección-extracción de la solución fisiológica artificial se emplearon dos bombas peristálticas de cassette Manostat, No. Cat. 13-874-610, flow rate 1.5-125 ml/hr.

Las muestras fueron recolectadas en microtubos Eppendorf de polipropileno, Brinkmann Inst. Co., No. Cat. 22 36 380-8.

Las placas para el ensayo inmunoenzimático fueron adquiridas de Costar, tipo Immulon II de fondo plano de 96 pozos. El anticuerpo de chivo anti-anticuerpo de rata utilizado fué adquirido de Peninsula Laboratories Europe, LTD.

El anticuerpo monoclonal fue amablemente proporcionado por la Dra. Ana Ma. Sierra H. del Instituto de Investigaciones Biomédicas y cuyas características son: fué obtenido de la hibridación de células mieloides de ratón (P3-X63-Ag8.6.5.3.) con células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con proteínas solubles provenientes de vesículas sinápticas.

Para evaluar la liberación de GABA exógeno se empleó ácido-gama-amino butírico tritiado (4-amino-N-(2,3,-H3) butiric acid) con una actividad específica de 25-40 Ci (925 GBq-1.48 TBq)/mmol, NEN Research Products, No. Cat. NET-191, DuPont.

Para la preparación de las distintas soluciones se emplearon reactivos grado analítico o reactivo de J.T. Baker, Merck y Sigma.

VI.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Se emplearon ratas Wistar machos con un peso entre 290 y 300 gr. Estas características son tomadas del atlas de Paxinos y Watson (96) de donde se tomaron también las coordenadas

estereotáxicas de las zonas a perfundir. El número de animales que se manejó fué variable de acuerdo con la etapa experimental, por lo que se indicará en cada fase el número de animales empleados.

VI.2 CANULAS.

La cánula "push" es una aguja de acero inoxidable de paredes delgadas calibre 27 con una longitud de 15 mm, soportada en un cilindro de teflón con rosca interna, llamandose en conjunto cánula conector, que lleva en su parte superior dos proyecciones de tubo calibre 21 por donde se conectan los sistemas de inyección-extracción. La cánula "pull" consiste en un tubo de acero inoxidable de paredes delgadas calibre 21 con una longitud de 12 mm. En su parte superior lleva un sistema de adaptación de teflón con rosca externa, que sirve para ajustarse a la cánula conector y formar en conjunto la cánula "push-pull", las agujas concéntricas ("push"-interna; "pull"-externa), presentan un espacio entre la parte externa de la "push" y la pared interna de la "pull" que es por donde va a fluir el líquido extraído.

De acuerdo con las zonas a perfundir (*Globus pallidus* y Caudado putamen) las características de la cánula son: la longitud de la cánula es de 11 mm y su diámetro externo de 1.0 mm; por medio de un esmeril y utilizando un microscopio estereoscópico se desgastaron las paredes del tubo externo hasta formar dos ranuras

opuestas con una longitud aproximada de 2.5 a 3.0 mm, quedando en forma de punta de desarmador. Las puntas del tubo externo deben ser lo suficientemente anchas como para proteger por completo a la cánula "push". Por último se le pone un punto de soldadura en la punta al tubo externo con una longitud máxima de 0.5 mm, esto para evitar que el tejido se meta tanto en la cánula "push" como en la "pull".

Para poder alcanzar la zona a perfundir y que la cánula permanezca fija en el cráneo del animal durante la perfusión, se implantó quirúrgicamente una cánula guía en la calota del animal, la cual consiste en un tubo de acero inoxidable con una longitud aproximada de 10 mm de calibre 18 que va a estar sujeta por medio de cemento acrílico a un cilindro de teflón con rosca interna que sirve de soporte y sujeción a la cánula.

VI.3 COORDENADAS.

Las coordenadas que se utilizaron para la implantación de la cánula guía son las siguientes: para *Globus pallidus*, antero-posterior= -1.1 mm, sagital= +3.25 mm y Vertical= -7.5 mm; y para Caudado putamen, antero-posterior= +0.5 mm, sagital= +3.0 mm y vertical= -6.5 mm. El punto que se tomó como referencia fué bregma, de acuerdo con el atlas que se utilizó. A este punto se le sumaron o restaron los valores de las coordenadas mencionadas

anteriormente.

El extremo inferior de la cánula guía se debe de colocar de 1 a 2 mm por arriba de la región que será alcanzada por la cánula "push-pull" en el momento de la perfusión, esto con el fin de evitar la formación de gliosis en el sitio de perfusión.

VI.4 SOLUCIONES EMPLEADAS.

Como medio de perfusión se utilizó un buffer de bicarbonatos Krebs-Ringer modificado, con la siguiente composición:

NaCl	127 mM
KCl	3.73 mM
CaCl ₂	1.8 mM
KH ₂ PO ₄	1.18 mM
MgSO ₄	1.18 mM
NaHCO ₃	20 mM
Glucosa	2.0 g/lit

Este medio se prepara dos horas antes de la perfusión y se filtra por membrana Millipore de 0.45 μ m, posteriormente se le hace burbujear una mezcla de CO₂/O₂ (5%/95%) por espacio de 5 min. o hasta que alcance un pH de 7.2.

Para la estimulación química del tejido se empleó una solución de potasio 50 mM. Esta solución se preparó tomando el medio base de Krebs-Ringer, modificando solamente la concentración de iones sodio a 77 mM y sustituyéndolos por iones potasio hasta una concentración de 50 mM.

Para estudiar la liberación de GABA exógeno se adicionaron 10 μ l del 3H-GABA al medio de perfusión, en una alicuota de 1750 μ l de medio, que se perfundieron en un período de tiempo de 32 min aproximadamente, lo que equivale a 4 muestras.

VII. METODOS.

VII.1 ANESTESIA.

Se empleó un anestésico volátil (halotano), el cual se administró por vía inhalatoria. La inducción se llevo a cabo con halotano al 5% en una mezcla de CO₂/O₂ (5%/95%, respectivamente) durante 5 min., posteriormente se coloca el animal en el estereotáxico y se conduce bajo un flujo continuo de halotano al 1% en la misma mezcla de CO₂/O₂, durante el tiempo que dure la cirugía.

VII.2 PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS.

La cirugía consistió en la implantación estereotáxica de la cánula guía en el cráneo del animal, bajo condiciones de antisepsia. Para la implantación de la cánula guía se anestesió al animal y se colocó en el estereotáxico, se descubrió el cráneo y se hizo un orificio de 2.0 mm de diámetro en la zona donde se ubicará la cánula guía de acuerdo con las coordenadas del atlas

estereotáxico. La cánula guía se mantiene sujeta al cráneo del animal por medio de la colocación de tres tornillos de sujeción además del vaciado de cemento acrílico en la zona en que se coloca la guía.

VII.3 PERFUSION.

Antes de iniciar la perfusión los animales se revisaron cuidadosamente observando que no tuvieran perturbaciones motoras o conductuales que indicaran que la implantación de la cánula guía haya producido un daño muy severo, cuando esto se presentó se sacrificó al animal. También se debe observar que la cánula guía no tenga ningún tipo de movimiento ya que de presentarlo la cánula se estará moviendo continuamente durante la perfusión lo que ocasionará continuas lesiones y sangrados en el animal.

Los sistemas de inyección-extracción se deben encontrar correctamente calibrados con el propósito de conocer el volumen de entrada y de salida y con esto evaluar la hidrodinámica del sistema, y en caso de que se presente alguna variación significativa corregir la alteración que se presenta o bien suspender la perfusión a causa de la lesión producida por el acúmulo de líquido o bien por la presión negativa ejercida en el tejido. Los flujos que se manejaron son los siguientes: inyección 50 ul/min; extracción 100 ul/min. Al mismo tiempo se deben

calcular los tiempos de retraso del líquido de perfusión, esto es, el tiempo que tarda en llegar el líquido del recipiente a la zona de perfusión y de ésta al tubo de recolección. El cálculo de estos tiempos no permite sincronizar el momento en que se debe hacer el cambio de soluciones para que las colecciones del material de interés sean puntuales y puedan ser colectadas en una sola fracción y no caigan diseminadas en una serie de fracciones.

Los animales fueron sometidos a una sola sesión de perfusión, la cual duró aproximadamente de 8 a 10 horas, comenzando siempre a las 9:00 A.M. aproximadamente, esto con la finalidad de no tener posibles variaciones debidas al ritmo circádiano del animal, las perfusiones se hicieron siempre en el hemisferio derecho del animal.

Los animales fueron colocados en cajas de acrílico transparentes en un cuarto aislado y con la menor cantidad de luz, cuidando que hubiera la menor cantidad posible de perturbaciones (ruido, variaciones de luz y temperatura, etc.). Los animales deben de permanecer por lo menos dos horas en este cuarto antes de iniciar la perfusión para evitar las variaciones que pueden propiciar la adaptación a este nuevo ambiente. Los animales se van a encontrar en libre movimiento dentro de las cajas de acrílico a lo largo de la perfusión.

Durante el transcurso de las perfusiones se vigiló continuamente la conducta del animal, si se presentó alguna

alteración de la misma se hizo la anotación correspondiente.

VII.4 RECOLECCION DE LAS MUESTRAS.

Las fracciones se recolectaron por espacio de 8 min cada una durante el tiempo que duro la perfusión. Para la recolección se usaron microtubos Eppendorf con una capacidad de 1500 ul. Los microtubos son colocados en un baño de hielo 10 minutos antes de su uso. Una vez recolectada la fracción se toma el microtubo y se coloca en hielo para posteriormente ponerlo en congelación.

VII.5 PROTOCOLO DE PERFUSION.

Para iniciar la perfusión se tomó al animal y se le retiró el mandril de la cánula guía, limpiándola para retirar rastros de sangre seca que pudieran contaminar las fracciones del perfusado, se tomó la cánula "push-pull" y se introdujo lentamente para evitar sangrado excesivo, una vez insertada se fija firmemente a la cánula guía para evitar cualquier movimiento de esta. Cuando se inserta la cánula ya deben de estar funcionando los sistemas de inyección-extracción.

Después de la introducción de la cánula se dejó el flujo del medio por espacio de 4 fracciones (32 min.) para lavar el sangrado ocasionado por la inserción de la cánula. Tomando en cuenta el tiempo de retraso, se administró el 3H-GABA por 4 fracciones (32 min.) el 3H-GABA que no fue retenido o tomado por el tejido fue lavado durante las dos siguientes horas de perfusión, esto desde la fracción 9 hasta la 24 (128 min.). En la fracción 25 se recolectó el material liberado por el primer estímulo químico, que duró 8 min, pasado el estímulo se dejó lavandose por espacio de 12 fracciones (96 min.) y en la fracción 38 se recolectó el material liberado por el segundo estímulo químico, también por espacio de 8 min. A partir de la fracción 39 se inicia de nuevo el lavado dejándose por espacio de 7 fracciones (56 min.) y en fracción 45 se indujo una lesión mecánica (sacando e introduciendo la cánula) y se recolectaron 5 fracciones más. Después de hecho esto se considera terminada la perfusión, se retira la cánula "push-pull" y se sacrifica al animal para extraer el cerebro y revizar la posición de la cánula.

VII.6 ENSAYO DE LAS MUESTRAS.

Una vez que han sido obtenidas las muestras es importante analizarlas, ya que la presencia o ausencia de algunas substancias nos sirven como controles que indicarán si la perfusión se encuentra bien o si ésta se presenta muy accidentada, así como

también es importante el análisis de las proteínas presentes en las muestras.

Dentro del análisis de los controles los más importantes son la liberación del 3H-GABA que se administró al animal al inicio de la perfusión así como la presencia de inmunoglobulinas en las muestras, que nos indicarán si se ha presentado un sangrado continuo durante la perfusión.

VII.7 3H-GABA.

Para el análisis del 3H-GABA se toman 20 ul de cada muestra y se colocan en un vial que contiene 5 ml de líquido de centelleo (tritosol) y se agitan hasta que se homogeniza la solución. Para su conteo se empleó un contador de centelleo (Beckman, Mod. LS 1701), que se programó para que contara durante un minuto cada muestra y la ventana de conteo solo permitiera el conteo de tritio. La lectura de cada una de las muestras fue reportada por el aparato como cuentas por minuto (cpm) y estas son directamente proporcionales a la cantidad de tritio presente en las muestras.

VII.8 INMUNOGLOBULINAS.

La determinación de las inmunoglobulinas presentes en las muestras se llevó a cabo utilizando un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Para poder llevar a cabo este ensayo fue necesario contar con un anticuerpo de chivo anti-anticuerpos de rata. El ensayo se llevo a cabo de acuerdo con la siguiente metodología: Se tomaron 50 ul de cada una de las muestras del perfusado diluidas (1:1) en Krebs-Ringer y se colocaron en cada uno de los pozos de una placa para ELISA dejándose incubar por espacio de 12 hrs a 4°C, se lavó y se bloqueó con una solución de Albúmina Sérica Bovina al 1% en PBS-Tween por espacio de 1 hr a 37°C, terminado el bloqueo se lavó y se le adicionaron 50 ul del complejo anticuerpo anti-anticuerpo de rata acoplado a enzima (peroxidasa), diluido (1:1000) en PBS-Tween-Alb incubándose por 2 hrs a 37°C, terminada la incubación se lava la placa, el agente revelador que se empleó fue una solución de O-fenilendiamina al 0.05% y H₂O₂ al 0.05% disueltos en un buffer de citratos-fosfatos (pH=5.2), de esta solución se adicionaron 50 ul a cada pozo de la placa y se dejó reaccionar por 10 min en un lugar oscuro y protegido de la luz, para detener la reacción se adicionaron 100 ul de H₂SO₄ 4N por pozo, se leyeron las placas en un lector de ELISA (Cambridge Technology Inc. Model 700) a una longitud de onda de 490 nm, la cantidad de color desarrollada en cada uno de los pozos fue proporcional a la cantidad de inmunoglobulinas presentes en cada una de las muestras del perfusado, todas las muestras se corrieron por duplicado.

Como un control del ensayo de inmunoglobulinas, y de la sensibilidad de la técnica empleada se realizó una prueba en la que se empleó suero normal de rata a diferentes diluciones y utilizando la técnica descrita previamente.

VII.9 LIBERACION DE PROTEINAS.

Para observar la presencia de las proteínas liberadas durante la perfusión, tanto en condiciones basales como en presencia del estímulo, se utilizaron técnicas bioquímicas tradicionales como es la cuantificación de proteínas por el método de Lowry (97) y por Bradford (98), así como un ensayo inmunoenzimático en donde se emplean anticuerpos monoclonales con la finalidad de optimizar la detección de estas proteínas haciéndola más específica y reproducible.

Tanto en el ensayo de Lowry como en el de Bradford se utilizó albúmina sérica bovina para elaborar la curva estándar y en base a esta poder calcular las concentraciones en cada una de las muestras del perfusado. Todas las muestras se manejaron por duplicado.

VII.10 LOWRY.

Para el ensayo de proteínas por el método de Lowry se siguió la metodología descrita originalmente (97) haciendo la adaptación a un microensayo, ya que la cantidad de muestra obtenida de los perfusados es muy reducida.

La metodología empleada fue la siguiente: a 100 ul de cada una de las muestras se le adicionaban 200 ul del reactivo de Lowry se agitaban y se dejaban reaccionar por 10 min, transcurrido este tiempo se le agregaban 50 ul del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma) diluido (1:1) con agua desionizada, agitando al momento de la adición y se dejaba reaccionar por 30 min. Esta reacción se llevaba a cabo en tubos de vidrio Pyrex, y de la solución final se tomaban 200 ul y se colocaban en los pozos de una placa de ELISA para su lectura, ya que se leían en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 625 nm, esta adaptación se hizo en base a lo reducido del volumen por lo que no era posible leerlo en un espectrofotómetro convencional ya que se requería de un volumen mínimo de 500 ul.

VII.11 BRADFORD.

El ensayo de Bradford se realizó siguiendo la técnica descrita en el reporte de dicho autor (98), manejándose también un

microensayo. A 80 ul de cada una de las muestras se le adicionaron 20 ul del reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, No cat 500-0006) dejándose reaccionar por 5 min, posteriormente se colocaron 100 ul en cada uno de los pozos de una placa de ELISA y se leyeron a una longitud de onda de 590 nm.

Tanto en el ensayo de Lowry como en el de Bradford se utilizó albumina sérica bovina para elaborar la curva estándar y en base a esta poder calcular las concentraciones en cada una de las muestras del perfusado. Todas las muestras se manejaron por duplicado.

VII.13 ENSAYO INMUNOENZIMATICO.

Para la realización del ensayo inmunoenzimático se utilizó un anticuerpo monoclonal obtenido de la hibridación de células mieloides de ratón (P3-X63-Ag8.6.5.3.) con células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con proteínas provenientes de vesículas sinápticas, de dicha hibridación se seleccionaron solo aquellos hibridomas cuyos anticuerpos reaccionaban positivamente con las proteínas presentes en los perfusados, de los cuales el hibridoma C3F3 fue el que dió una mayor respuesta por lo que este se empleó para el estudio de la liberación de proteínas. El hibridoma se inyectó intraperitonealmente a ratones BALB/c para que desarrollaran ascitis y de esta forma obtener una mayor cantidad

de anticuerpos monoclonales; se extrajó el líquido ascítico se centrifugó y se congeló en alicuotas. Estas se usaron en los ensayos inmunoenzimáticos.

El ensayo inmunoenzimático es en esencia el mismo que el describió por Engvall (99, 100). Se tomaron 50 ul de cada una de las muestras diluídas (1:1) en Krebs-Ringer y se colocaron en cada pozo de una placa para ELISA, incubándose por 12 hrs a 4°C. Después de esta incubación se lavaron las placas con PBS-Tween y se bloquearon con una solución de PBS-Tween-BSA (1%) por 1 hr a 37°C, transcurrido este tiempo se lavaron de nuevo las placas y se incubaron con el anticuerpo monoclonal adicionando 50 ul de una dilución (1:1000) en cada pozo, se incubó por 2 hrs a 37°C; terminada la incubación se lavó y se adicionó el complejo anticuerpo anti-anticuerpo de ratón acoplado a una enzima (peroxidasa) agregando un volúmen de 50 ul en cada pozo de una dilución (1:1000) en PBS-Tween-BSA dejándose incubar por 2 hrs a 37°C. Como agente revelador se utilizó una solución de O-fenilendiamina al 0.05% y H₂O₂ al 0.05% en un buffer de citratos-fosfatos (pH=5.2), se adicionaron 50 ul de esta solución en cada pozo después de haberlo lavado y se deja reaccionar por 10 min en un lugar obscuro deteniendo la reacción con 100 ul de H₂SO₄ 4N y se leyeron las placas en un lector de ELISA a una longitud de onda de 490 nm.

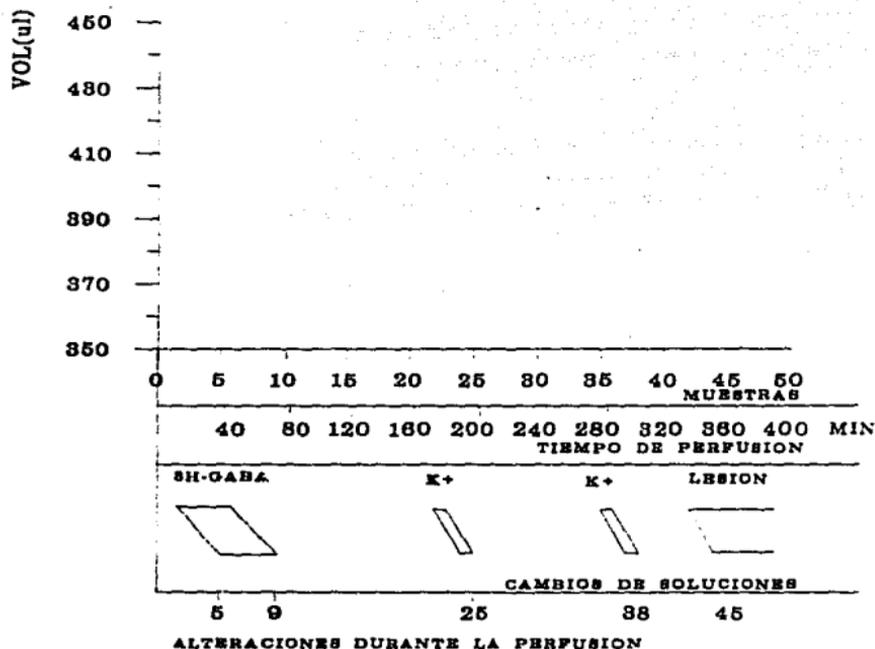
VIII. RESULTADOS.

Como un primer paso para abordar los resultados que aquí se presentan se analizarán los controles que se utilizaron, esto con la finalidad de dar confiabilidad a los experimentos realizados, así como poder discriminar aquellas perfusiones que no cumplen los requisitos necesarios para incluirlas en el análisis general de los resultados.

El llenado de la hoja de registro (figura 4) durante el transcurso de la perfusión es uno de los primeros procedimientos (cualitativo) que nos permite visualizar el perfil de la perfusión.

La realización de las curvas estándar (figura 5) para la cuantificación de proteínas fué de gran importancia debido a la adaptación que se hizo de dichas técnicas, y el obtener curvas con una regresión lineal cercana a 1.000 ($r^2 = 0.9997$ para Lowry y $r^2 = 0.9989$ para Bradford) nos permite considerar a dichas técnicas como las adecuadas para la cuantificación de proteínas.

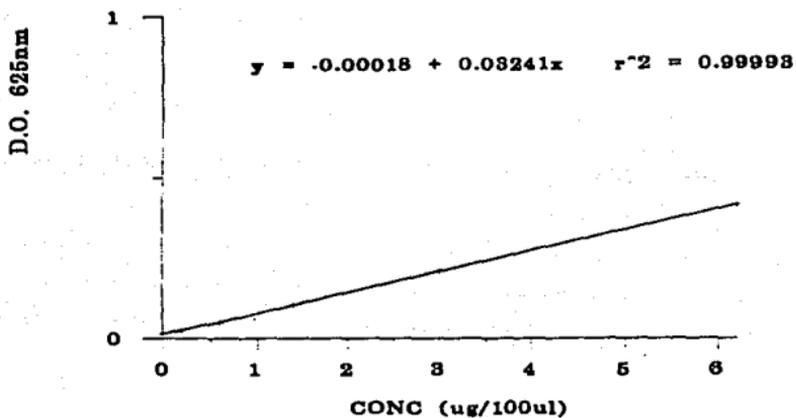
DATOS ANIMAL:



SANGRADO
 VOLUMEN
 OBSTRUCCIONES
 CONDUCTA
 OBSERVACIONES

FIGURA 4. Hoja de registro del desarrollo de una perfusión, en donde se anota el registro del volumen de recolección en la parte superior, así como la conducta del animal durante el transcurso de la misma en la parte inferior. En la parte central del esquema se anotan los tiempos en que deben de hacerse los cambios de solución de acuerdo con los tiempos de retraso.

CURVA ST LOWRY



CURVA ST BRADFORD

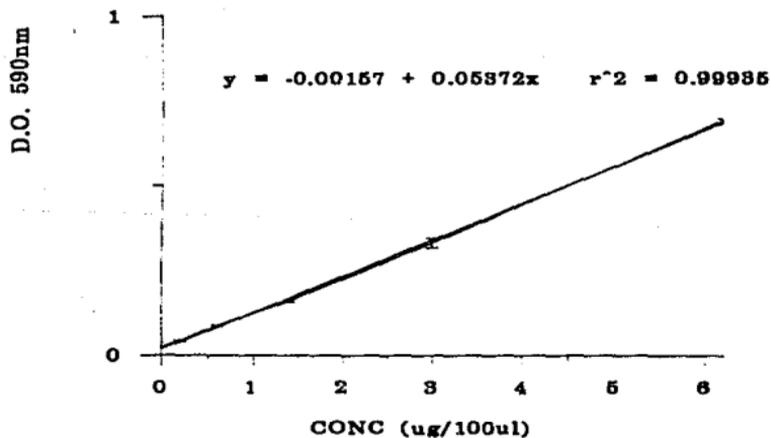


FIGURA 5. Curvas estándar de cuantificación de proteínas. Se utilizaron diferentes soluciones de BSA de concentraciones conocidas (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 ug/100ul).

La evaluación de las inmunoglobulinas del suero normal de rata por la técnica de ELISA (figura 6) nos permite ver el rango de dilución de suero presente en las muestras de los perfusados.

VIII.1 PERFUSIONES BASALES.

La obtención de perfusiones basales se realizó con el objeto de poder observar las características generales de una perfusión sin tener ningún tipo de variable como puede ser; el cambio de soluciones, la concentración de algún ion de la solución o bien introducir metabolitos en dichas soluciones.

Estas perfusiones se llevaron a cabo en el Caudado putamen así como en el Globus pallidus y el protocolo seguido fue el mismo que se propuso para una perfusión normal solo que después de introducir la cánula no se hizo ninguna manipulación, solamente se indujo la lesión al final de la misma (figura 7 y 8), el número de animales empleados en este ensayo fue de uno para cada área perfundida.

La evaluación de la hidrodinámica del sistema se puede hacer a través de las gráficas de recuperación de volúmenes las cuales son representativas de buenas perfusiones o de aquellas en las que se haya presentado algún problema de obstrucción de la cánula o desequilibrio en el sistema inyección-extracción, por lo que estos datos nos sirven para poder decidir si una perfusión es confiable

D.O. 492nm

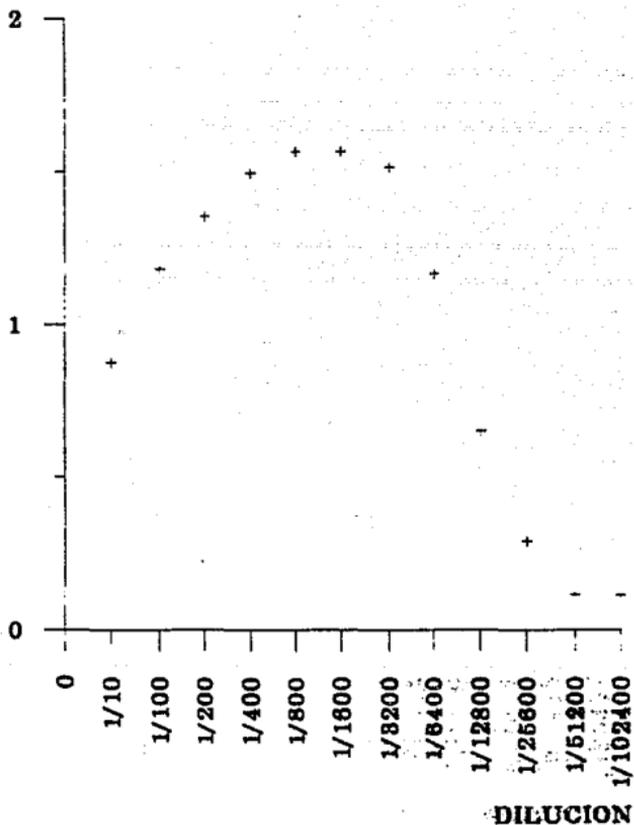


FIGURA 6. Curva de titulación de suero normal de rata con un anticuerpo de cabra anti-anticuerpos de rata, utilizando la técnica de ELISA.

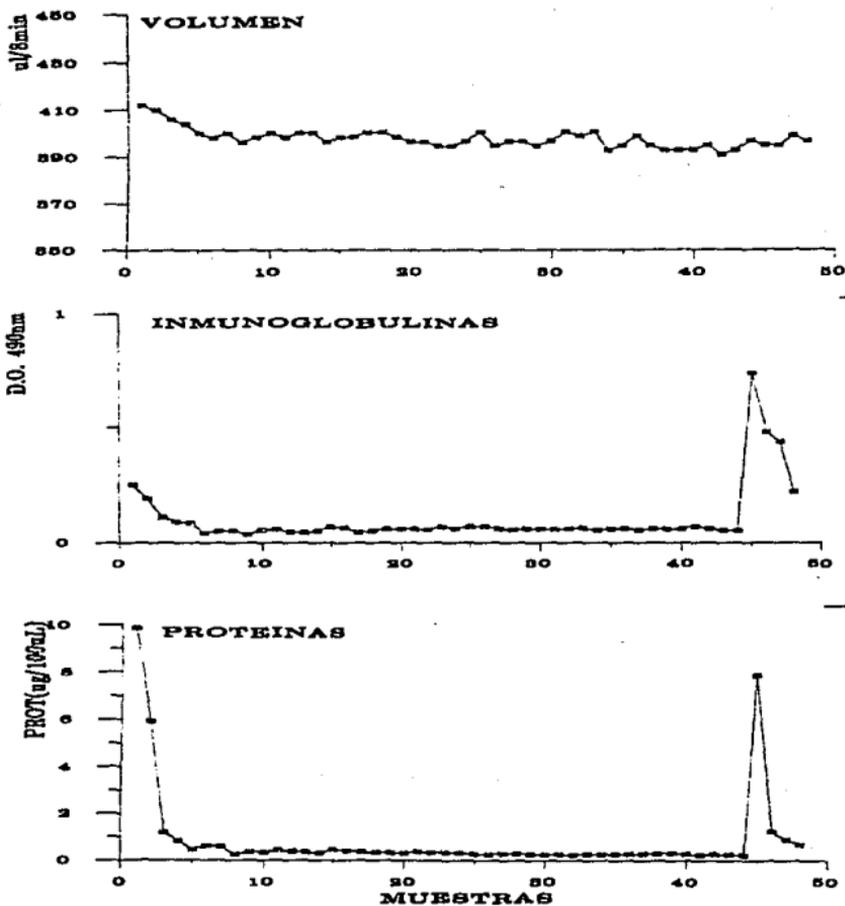


FIGURA 7. Perfil de perfusión basal de Caudado putamen sin accidentes.

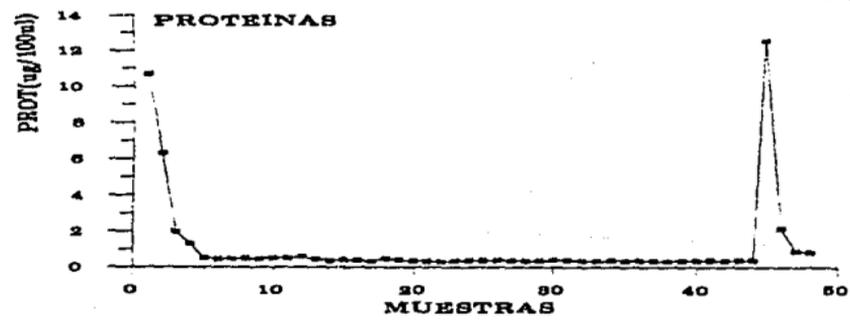
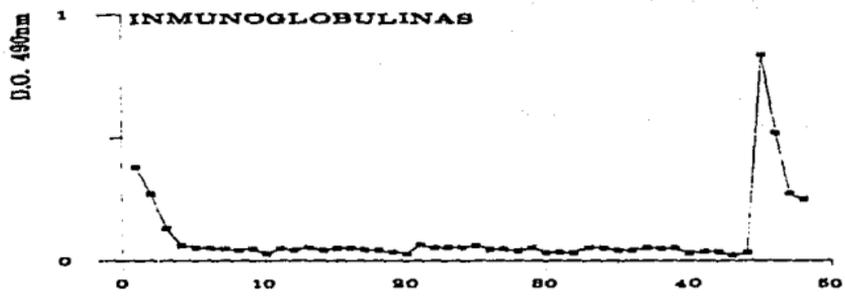
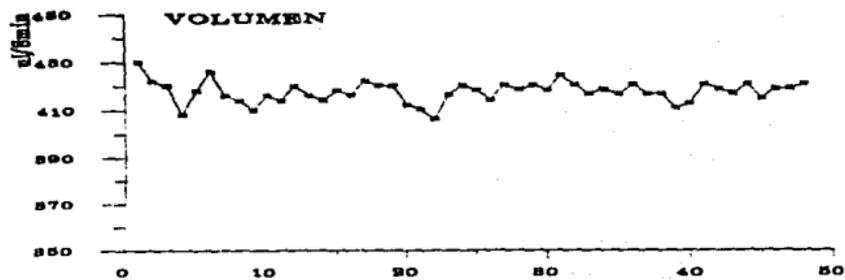


FIGURA 8. Perfil de perfusión basal de Globus pallidus sin accidentes.

o si se encuentra lo suficientemente accidentada como para descartarla. Como se muestra en las figuras 7 y 8 podemos observar el perfil de una perfusion libre de accidentes en contraste con una perfusión accidentada (figura 9) en donde aunque se trató de corregir el problema de obstrucción de la cánula y continuar con la perfusión se presentaron de nuevo accidentes, por lo que de acuerdo con la experiencia obtenida se puede decir que una vez que se presente una obstrucción en el transcurso de la perfusión esta se encuentra prácticamente inválida ya que este accidente retrasará todo el desarrollo del protocolo de la perfusión y por lo tanto tendrá un desfaseamiento que hará que no sea comparable con perfusiones libres de accidentes.

Posteriormente se les cuantificaron las inmunoglobulinas a las muestras con la finalidad de obtener una línea base de las inmunoglobulinas presentes y poder diferenciar entre las que se encuentran a causa de una lesión y las que son recolectadas como parte del proceso de erosión que se ejerce sobre el tejido perfundido.

El estudio de la presencia de proteínas en estas perfusiones nos permite observar su liberación en condiciones basales, esto solo como un control del desarrollo metodológico, así como una verificación de que tanto la técnica como los cambios realizados a la misma no la afectan significativamente ya que resultados similares han sido reportados por Greenfield (50) y Bayón (52).

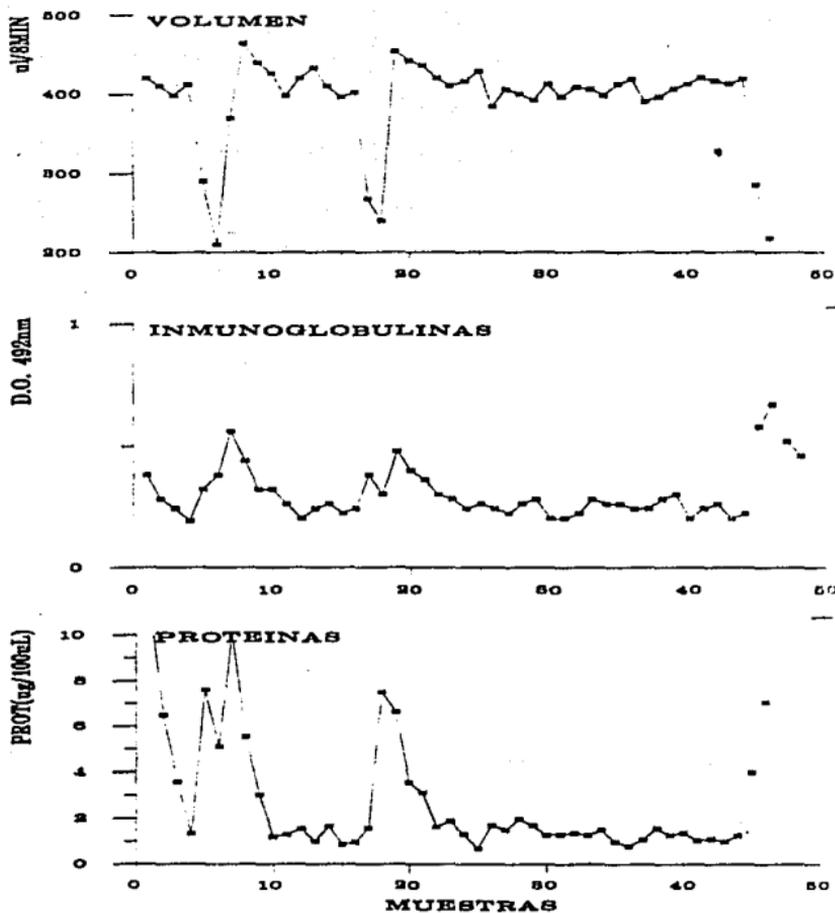


FIGURA 9. Perfil de una perfusión accidentada (doble obstrucción de cánula).

En la tabla I se presentan los valores promedio de las perfusiones basales, como podemos observar las medias del volumen no son iguales, pero si son muy parecidas sus varianzas, esto va a depender de la exactitud al momento de calibrar el sistema de inyección-extracción y de su eficiencia durante el transcurso de la perfusión, pero es importante señalar que va a significar mayor relevancia el valor de la varianza que el valor promedio ya que nos permite tener un control de la variabilidad esperada más que un valor neto de gasto volumétrico.

	Caudado putamen	Globus pallidus
VOLUMEN (uL/8 min)	397.2 +/- 4.3	417.1 +/- 4.42
INMUNOGLOBULINAS * (D.O. 492nm)	0.055 +/- 0.01	0.043 +/- 0.009
PROTEINAS * (ug/100uL)	0.49 +/- 0.06	0.58 +/- 0.06

TABLA I. Valores promedio de las perfusiones basales presentadas en las figuras 7 y 8.

- * Para inmunoglobulinas y proteínas no se consideraron aquellas colecciones en que se presentó sangrado (introducción de la cánula y lesión).

VIII.2 PERFUSIONES.

Posterior a la obtención de las perfusiones basales y la correcta adecuación de las técnicas de detección se procedió a realizar las perfusiones con estimulación química e introduciendo un control de liberación (3H-GABA). Estas perfusiones se realizaron en Caudado putamen y Globus pallidus.

Se analizaron los resultados de las perfusiones obtenidas de 8 ratas machos (cuyo peso se encontraba en un intervalo de 280-310 gr) cuatro en putamen y cuatro en pallidus, implantadas con cánula guía en el hemisferio derecho. Después de un postoperatorio de 7 días, las ratas fueron perfundidas con la cánula de inyección-extracción siguiendo el protocolo descrito previamente.

La administración del 3H-GABA fue a partir de la fracción 5 y durante cuatro fracciones se perfundieron 10 uCi de 3H-GABA (1 uCi/ul, actividad específica de 34.7 uCi/mmol) en un volumen de 1750 ul. Este aminoácido al ser captado por las células de la zona perfundida en el S.N.C. será susceptible de ser liberado posteriormente mediante la estimulación de las mismas. Lo anterior nos permitió evaluar la funcionalidad del tejido perfundido al establecer el grado de respuesta de las células mediante la cuantificación de los picos de liberación, sobre una basal. Como se puede observar en la figura 10, A y B, al inicio de las perfusiones se presenta una etapa de meseta que es en la que se administra el 3H-GABA, y se debe a que el 3H-GABA que no es

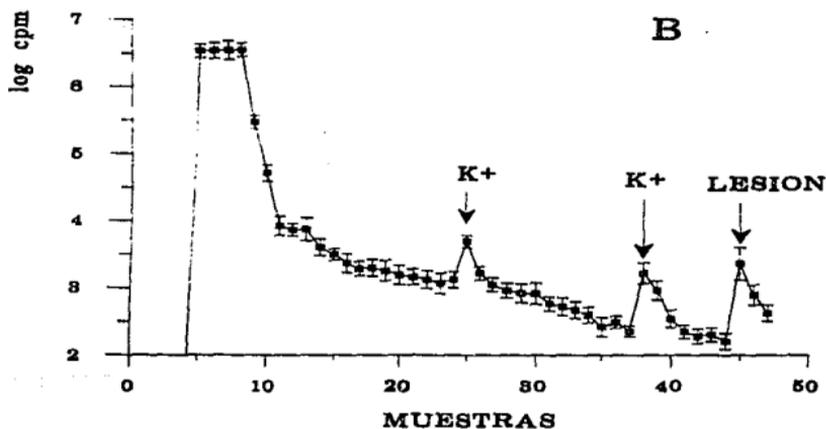
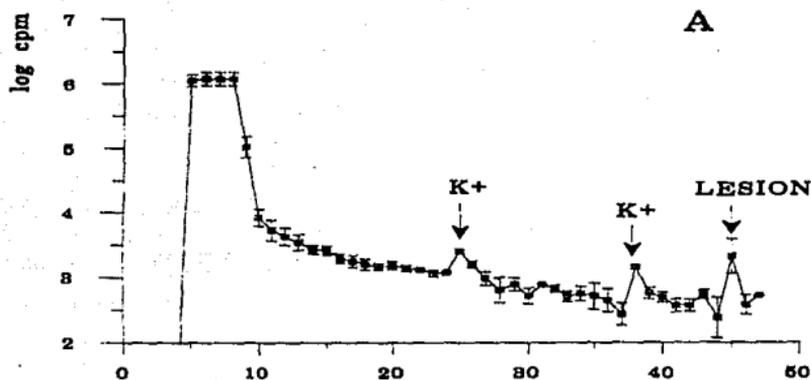


FIGURA 10. Liberación de 3H-GABA durante perfusiones de Caudado putamen (A) y Globus pallidus (B). Después de la administración del 3H-GABA se dejó lavar el tejido por espacio de 2 hrs , y se dieron dos estimulaciones químicas con K+ 50 mmol. Al final de la perfusión se indujo una lesión mecánica.

captado por el sistema es recolectado de nuevo y tomado como el punto de inicio de la liberación ya que es el valor máximo que puede alcanzar la liberación, posterior a la administración viene un proceso de lavado en donde el 3H-GABA que difundió y que no fue captado por las células es retomado por el líquido de perfusión y colectado en las muestras. Al momento de dar el estímulo químico se observa un aumento en la cantidad de 3H-GABA liberado como parte del proceso de liberación del material contenido en las vesículas sinápticas observandose una clara diferencia entre la cantidad de 3H-GABA presente en esta colección y la línea basal presentada por el lavado y por la liberación continua que se da durante la perfusión. Al final de la perfusión se puede observar otro pico de liberación el cual se debe a la lesión mecánica (sacar y meter de nuevo la cánula) inducida como un control de liberación masiva, ya que al lesionar el tejido y haber rompimiento de células habrá un aumento tanto de 3H-GABA como de inmunoglobulinas y de proteínas.

Durante el proceso de análisis de las muestras se realizó el ensayo de ELISA para observar la presencia de inmunoglobulinas en las colecciones con el fin de visualizar si hubo alguna lesión considerable durante las perfusiones, y descartar la posibilidad de que el incremento de proteínas durante la estimulación sea producto de alguna lesión en el tejido o bien haya un proceso de extravasación sanguínea que pueda contaminar los perfusados, pero como se observa en la figura 11 los niveles de inmunoglobulinas presentes en los perfusados no se incrementan durante el transcurso de la perfusión, con excepción del momento en que se

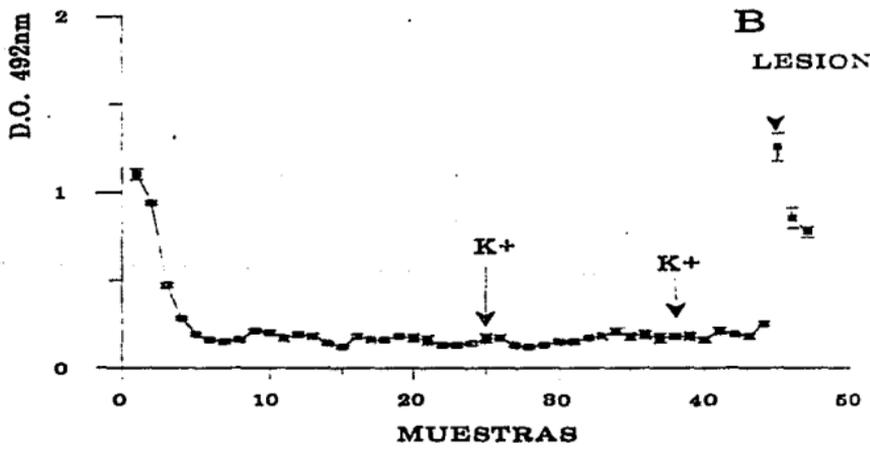
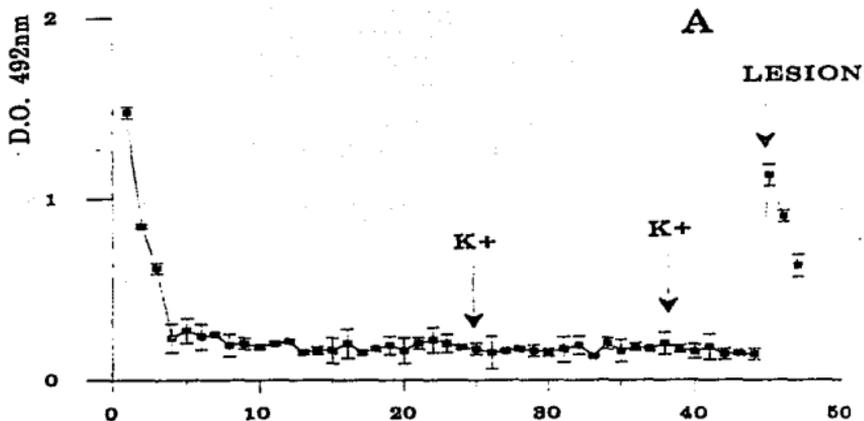


FIGURA 11. Detección de inmunoglobulinas en perfusiones de Caudado putamen (A) y Globus pallidus(B).

introduce la cánula y en la inducción de la lesión. Otra posible alteración que se podría presentar durante el estímulo químico es que haya lisis celular y por lo tanto liberación de material proteico, pero en un trabajo previo realizado por Bayón y col. (52) en donde cuantifican la lactato deshidrogenasa, una enzima intracelular, observaron que durante el transcurso de la perfusión, así como en el momento de dar el estímulo esta no aumentaba sus niveles, por lo que descartan la posibilidad de que la liberación de proteínas durante la estimulación sea producto de lisis celular, o de algún proceso de extravasación como lo demuestra la ausencia de inmunoglobulinas al momento de estimular al tejido.

A las colecciones de estas perfusiones se les cuantificaron las proteínas por el método de Lowry y se promediaron los resultados, se graficaron estos valores anotando la varianza de los mismos, marcándose en la gráfica las fracciones en las que se dio la estimulación con K^+ (50 mmol). La liberación por estimulación es aquella en la cual se provoca la salida de una determinada molécula biológica de la(s) célula(s), esta estimulación puede ser con una sustancia química despolarizante y la molécula liberada puede ser un neurotransmisor o una proteína (enzimática o no) como en este estudio.

Durante el transcurso de la perfusión se observa que se mantiene una línea basal de liberación de proteínas y solo se ve un incremento en los valores de estas proteínas en el momento de estimular con K^+ 50 mmol y durante dos o tres fracciones

subsecuentes a la estimulación, esto se debe a la difusión del K⁺ así como a la liberación tardía a causa de esta difusión (figuras 12 y 13).

Posteriormente se compararon los valores del promedio de la línea basal de liberación de proteínas con la media de las fracciones en donde se presentó la liberación por estimulación con la finalidad de poder observar si hay una diferencia significativa entre estos valores (figura 14).

VIII.3 ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE LOS PERFUSADOS.

Otra etapa del desarrollo experimental fue detectar las proteínas liberables durante la perfusión utilizando un ensayo inmunoenzimático además de los métodos bioquímicos tradicionales. Para llevar a cabo este estudio fue necesario contar con un anticuerpo monoclonal el cual fue cedido amablemente por la Dra Ana María Sierra H. del Instituto de Investigaciones Biomédicas y cuyas características son: fue obtenido de la hibridación de células mieloides de ratón (P3-X63-Ag8.6.5.3.) con células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con proteínas solubles provenientes de vesículas sinápticas, de esta hibridación se tomaron aquellas colonias que tuvieron un buen crecimiento y se clonaron hasta obtener cultivos cuyos productos de secreción reconocieran proteínas solubles de vesícula sináptica en un ensayo inmunoenzimático.

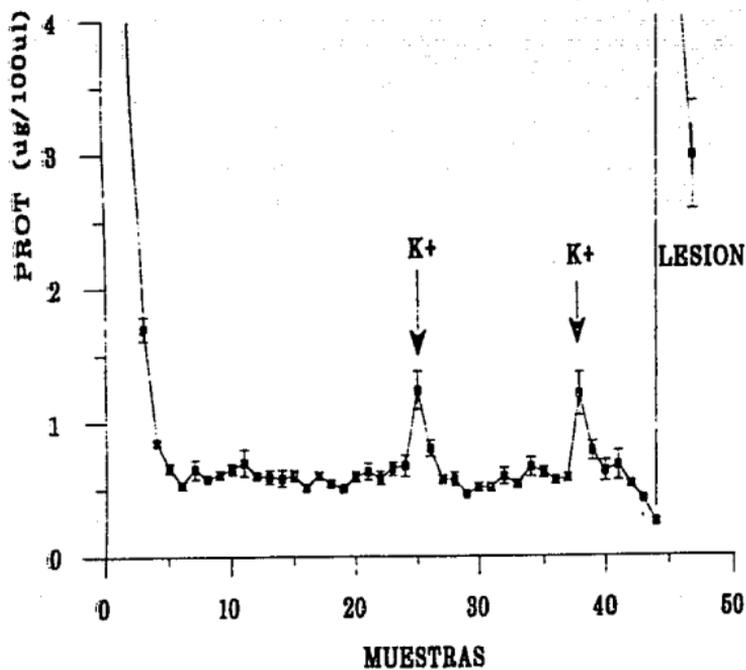


FIGURA 12. Perfil de liberación de proteínas en Caudado putamen. La concentración de proteínas se reporta como microgramos de proteínas por 100 microlitros de perfusado.

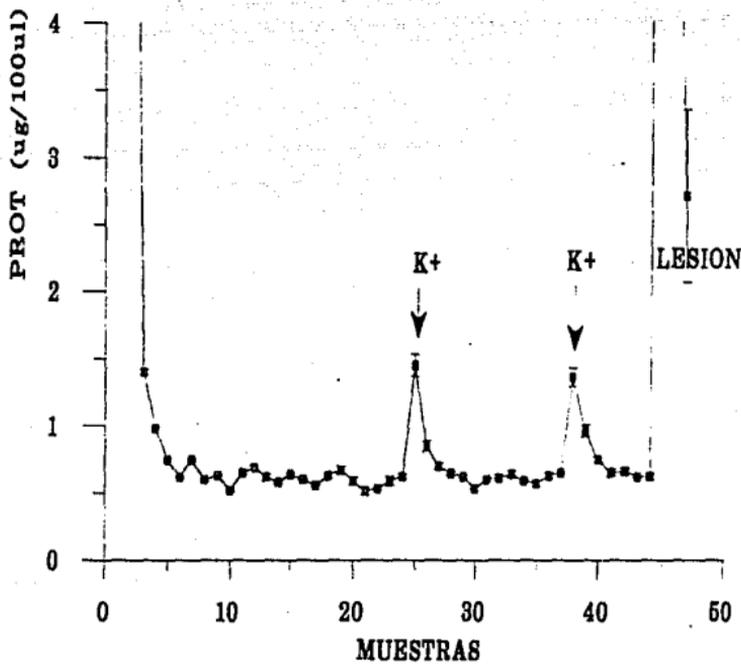


FIGURA 13. Perfil de liberación de proteínas en Globus pallidus. La concentración de proteínas se reporta como microgramos de proteínas por 100 microlitros de perfusado.

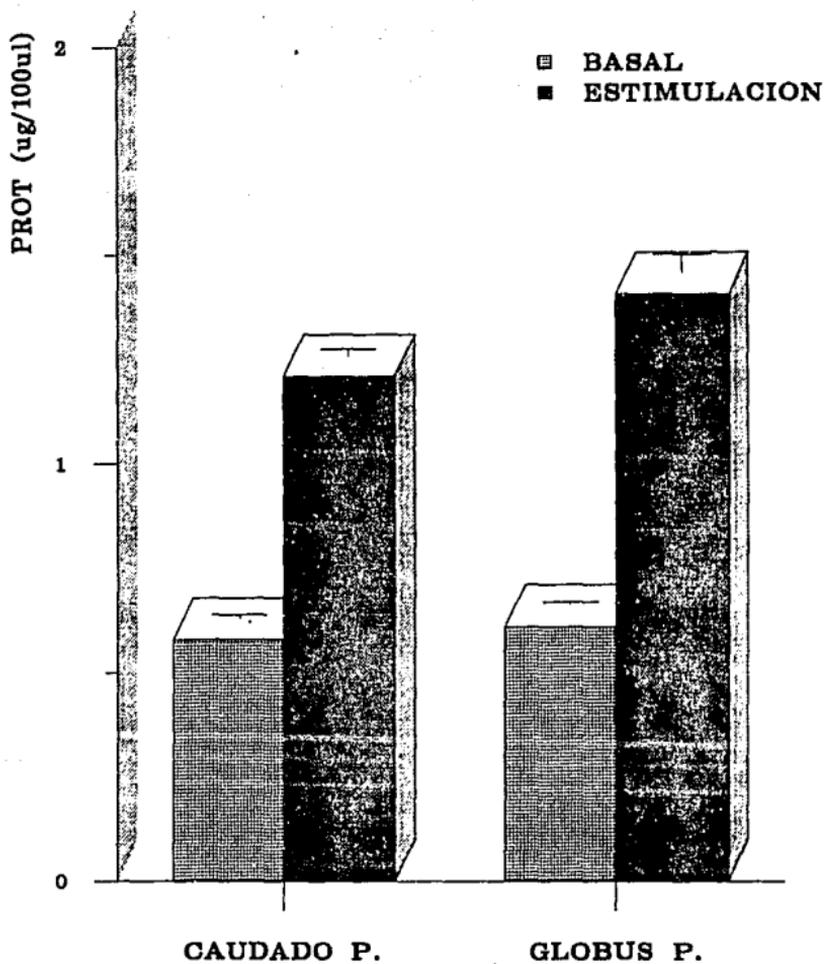


FIGURA 14. Comparación de las proteínas liberadas en condiciones basales y de estimulación tanto en Caudado putamen como en Globus pallidus.

De entre el total de hidridos seleccionados se escogieron aquellos que dieron una mayor respuesta y se probaron de nuevo, solo que ahora se utilizó una mezcla de colecciones basales de perfusión como antígeno, para observar cual de ellos tenía una mayor afinidad por el antígeno (figura 15). Para probar los hibridomas estos se inyectaron intraperitonealmente junto con pristano a ratones BALB/c para que desarrollaran ascitis. Ya que los ratones manifestaron ascitis se extrajo el líquido ascítico por punsión peritoneal y se centrifugó separando las células del sobrenadante, el cual se guardó en congelación, ya que este líquido rico en anticuerpos monoclonales se empleó para los ensayos inmunoenzimaticos de los perfusados. Obteniendose como resultado que el anticuerpo producido por el hibridoma C3F3 es el que daba una mayor especificidad ante diferentes diluciones del antígeno.

Para evaluar la eficiencia del anticuerpo obtenido se perfundieron 8 ratas machos (con un intervalo de peso de 280-310 gr) perfundiendose cuatro en C. putamen y cuatro en G. pallidus después de un postoperatorio de 7 días mínimo y siguiendo el protocolo de perfusión presentado previamente.

A las muestras obtenidas de estas perfusiones se les cuantificó el 3H-GABA de la misma forma como se describió previamente (figura 16) al igual que se realizó el ensayo inmunoenzimático para inmunoglobulinas (figura 17).

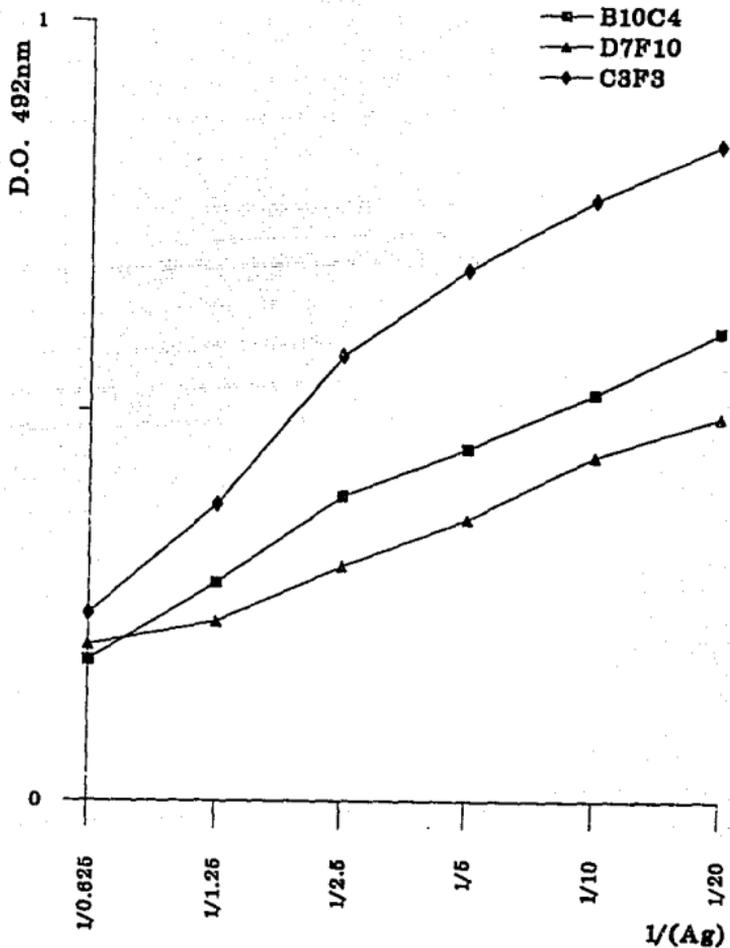


FIGURA 15. Cuantificación de la afinidad de tres diferentes anticuerpos monoclonales por el antígeno (proteína proveniente de perfusiones intracerebrales) a diferentes diluciones utilizando la técnica de ELISA.

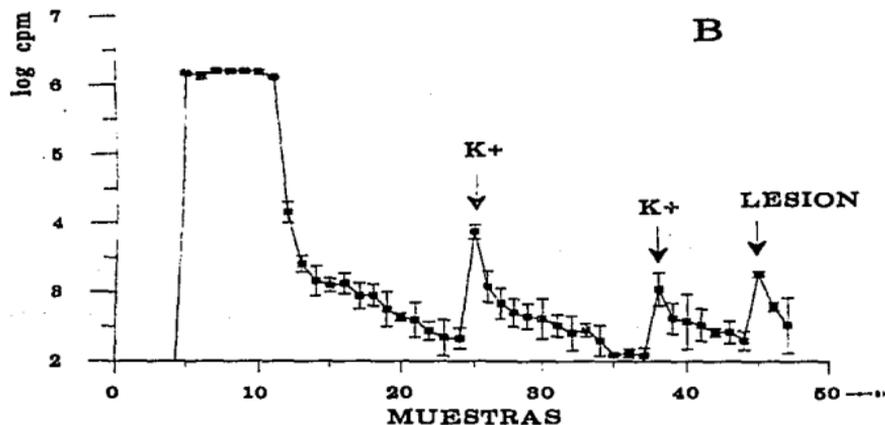
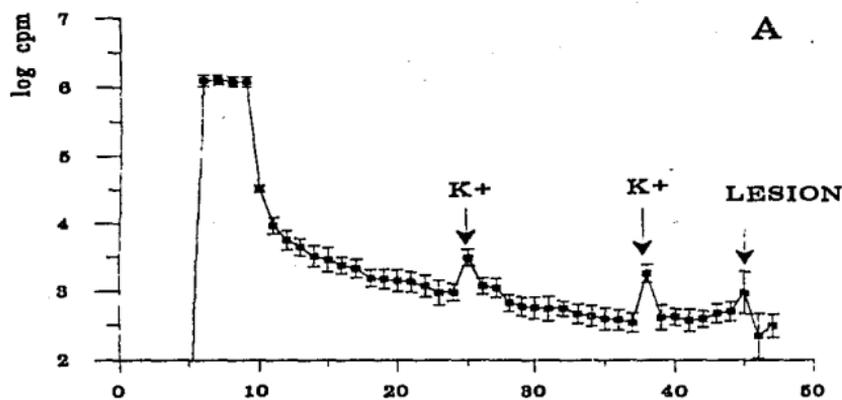


FIGURA 16. Liberación de 3H-GABA durante perfusiones de Caudado putamen (A) y Globus pallidus (B). Después de la administración del 3H-GABA se dejó lavar el tejido y se dieron dos estimulaciones químicas con K^+ 50 mmol.

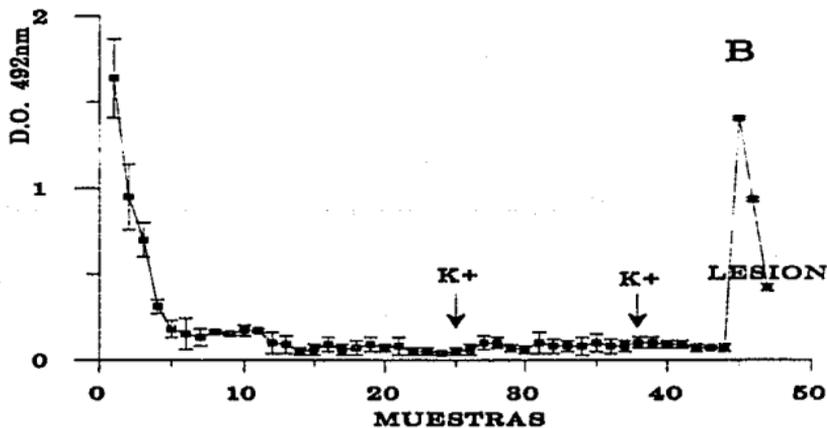
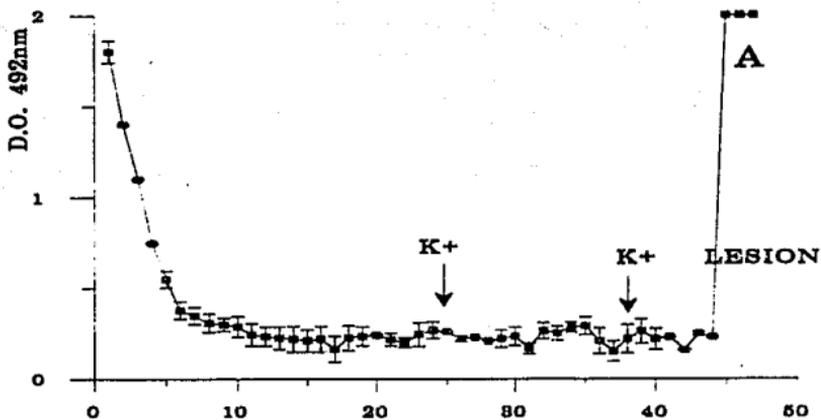


FIGURA 17. Detección de inmunoglobulinas en perfusiones de Caudado putamen (A) y Globus pallidus (B).

Para la cuantificación de las proteínas presentes en los perfusados se utilizó la técnica de Bradford (figura 18). Este cambio de técnica obedece a que en este momento la cuantificación por métodos tradicionales solo se manejó como un control de la presencia de material proteico liberado en los perfusados y no como en el caso anterior, en donde el objetivo era observar la liberación de proteínas utilizando métodos bioquímicos, por lo que en esa ocasión se utilizó la técnica de Lowry, la cual es más sensible, pero a su vez es mucho más laboriosa que la técnica de Bradford.

El ensayo inmunoenzimático realizado a los perfusados se llevó a cabo como se describió en materiales y métodos empleando el anticuerpo monoclonal producido por el hidridoma C3F3 observándose el mismo patrón de liberación que en el caso de la cuantificación bioquímica de las proteínas, solo que en este caso el anticuerpo va a estar dirigido contra una proteína en especial, por lo que la detección será más específica, notándose por ejemplo que el valor de la lectura de las primeras muestras así como en las que está la lesión con respecto a la basal no son tan altas como en el caso de la detección con Lowry o Bradford que van a cuantificar indiscriminadamente todas las proteínas presentes en los perfusados no siendo así el caso del anticuerpo monoclonal (figuras 19 y 20).

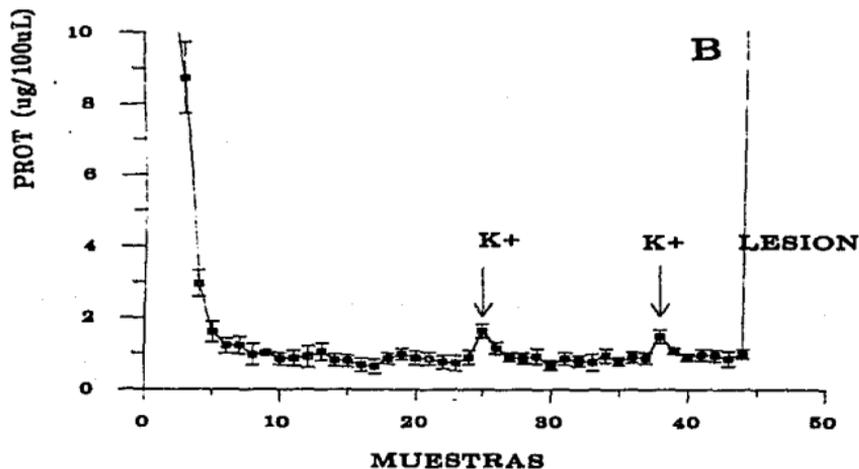
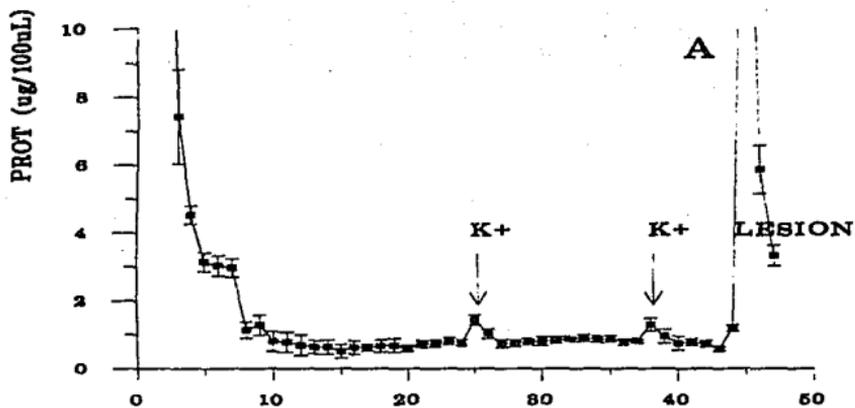


FIGURA 18. Perfil de liberación de proteínas en Caudado putamen (A) y Globus pallidus (B). Cuantificadas por el método de Bradford.

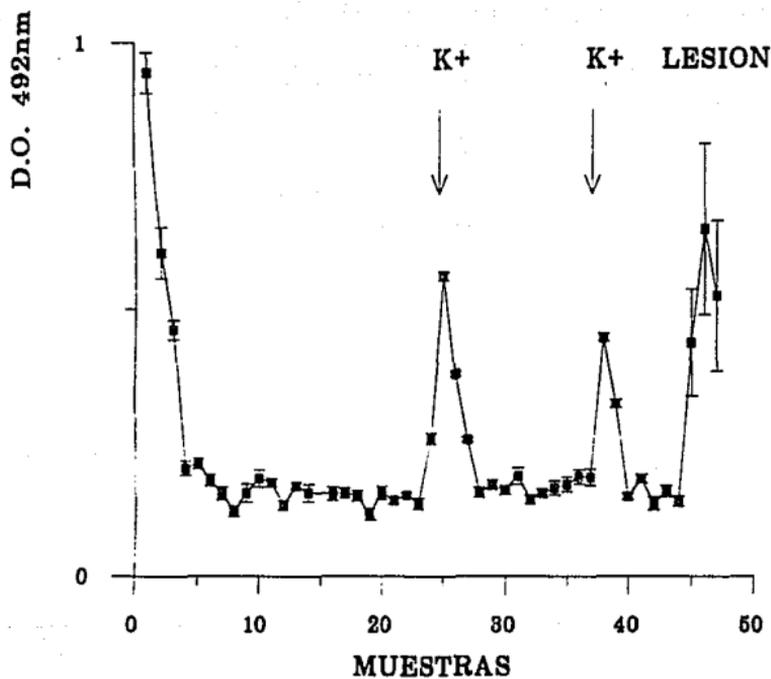


FIGURA 19. Perfil de liberación de proteínas en Caudado putamen empleando el anticuerpo monoclonal C3F3 en un ensayo inmunoenzimático.

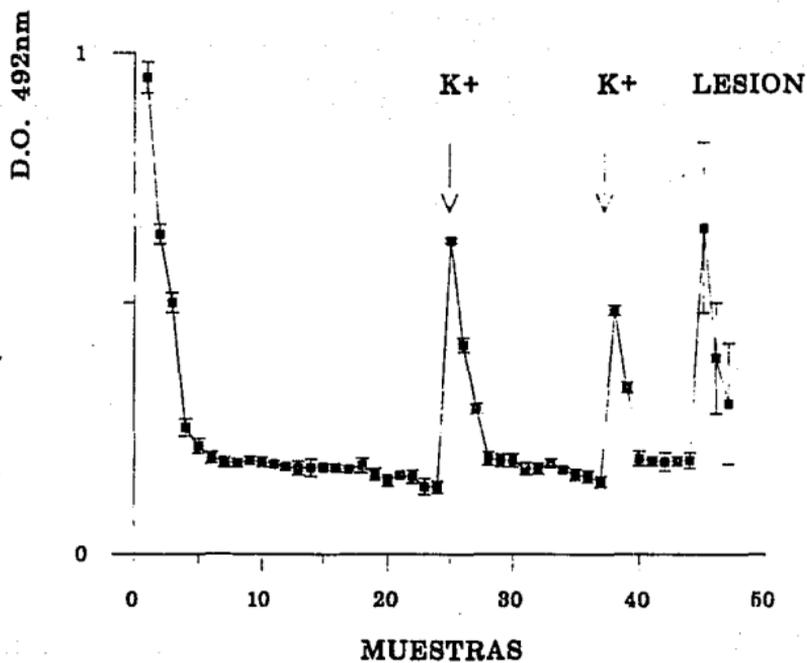


FIGURA 20. Perfil de liberación de proteínas en Globus pallidus empleando el anticuerpo monoclonal C3F3 en un ensayo inmunoenzimático.

Por último en la figura 21 se observa la comparación de la línea basal de liberación de proteínas con las proteínas liberadas durante la estimulación química, tanto en *C. putamen* como en *G. pallidus*, utilizando el anticuerpo monoclonal en un ensayo de ELISA.

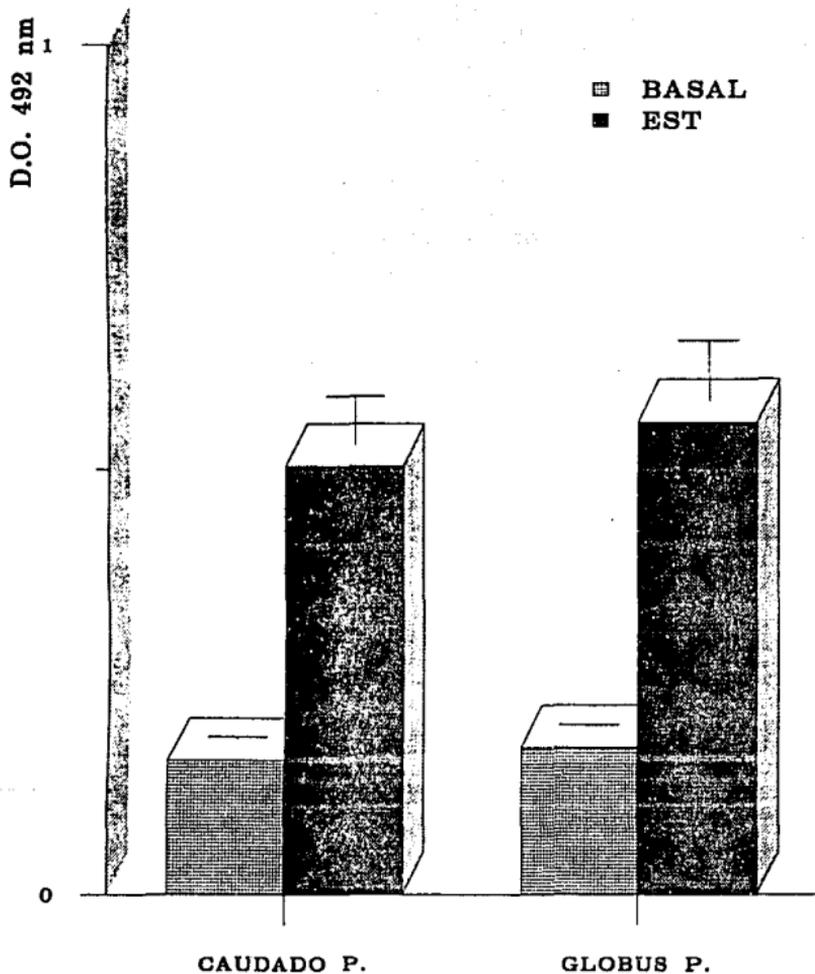


FIGURA 21. Comparación de las proteínas liberadas en condiciones basales y de estimulación tanto en Caudado putamen como en el Globus pallidus.

IX. DISCUSION.

Gran parte de los resultados aquí presentados estan directamente relacionados con la liberación de proteínas en perfusiones intracerebrales y su detección por métodos bioquímicos e inmunoenzimáticos, centrándose en estos aspectos el desarrollo de la presente discusión.

Antes de analizar los resultados es importante señalar la relevancia del buen manejo del animal durante el desarrollo experimental ya que de presentarse, por ejemplo, alguna variación en el transcurso de la cirugía o en la colocación de la cánula esto afectará considerablemente los resultados que se obtengan y cuyas alteraciones pueden ir desde que el animal presente perturbaciones conductuales severas a causa de la lesión quirúrgica hasta que una mala implantación de la guía haga que se perfunda una zona diferente a la deseada.

En lo referente a la técnica de perfusión se presentaron tres puntos principales a considerar que son: a) obstrucción de la cánula; b) desequilibrio en el sistema de inyección-extracción del líquido de perfusión y c) sangrado durante la perfusión.

Las obstrucciones de la cánula que se llegaban a presentar durante el desarrollo de las perfusiones se deben principalmente a

fragmentos de tejido que se meten en la cánula o bien a la formación de coágulos en la misma. Estas obstrucciones son de gran relevancia durante la perfusión ya que de llegar a presentarse ponen en alto riesgo el éxito de la misma, dependiendo de la gravedad de la obstrucción. Si se presenta la obstrucción se puede hacer el intento de reestablecer las condiciones normales de perfusión, esto sacando la cánula y limpiándola rápidamente para retirar el material que obstruye y volverla a insertar, o bien cambiando la cánula obstruida por otra de las mismas dimensiones, haciendo las anotaciones correspondientes y tomando en cuenta que el desarrollo de la perfusión no será igual a las demás perfusiones debido a que las fracciones de recolección se van a recorrer y por lo tanto estarán desfasadas de las demás. Otro punto importante con respecto a esto, es que de acuerdo con la experiencia obtenida después de presentarse alguna obstrucción durante el transcurso de la perfusión el éxito de ésta será mínimo, esto debido principalmente a que el tejido se encuentra lesionado considerablemente, como consecuencia del acúmulo del líquido, y por lo tanto no responde adecuadamente y pueden presentarse variaciones muy altas, como lo demuestra la figura 9.

En lo que respecta al punto b), el sistema de inyección-extracción debe presentar por lo menos las siguientes características: equilibrio de presiones y de flujos en los sistemas de inyección-extracción; y capacidad de mantener un flujo constante de perfusión.

El equilibrio de presiones se debe de mantener constante ya que si la presión de la cánula de inyección es mayor que la de la cánula de extracción, se corre el riesgo de que se quede líquido en la zona de perfusión, si se presenta el caso contrario, la presión negativa ejercida por la cánula de extracción hará que el tejido de la zona de perfusión se incruste en la punta de la cánula ocasionando obstrucciones y lesión.

Un indicativo visible de lesión en la zona de perfusión es la presencia de sangre en el líquido recolectado, pero la mayoría de las veces este sangrado no es visible y sin embargo es necesario detectarlo. Como se puede observar en las gráficas tanto al inicio como al final de la perfusión a causa de la inserción o remoción de la cánula se presenta sangrado, pero este también se puede presentar si la guía de la cánula presenta algún tipo de movimiento por lo que es importante el revisar las condiciones de ésta al inicio de la perfusión.

Con referencia a estas observaciones hay que considerar que también es importante el papel que juega la resistencia que presenta al flujo el sistema biológico y por lo tanto la erosión que va a causar el líquido sobre el tejido.

Por todo lo anterior podemos decir que entre mayor número de obstrucciones, extracciones de la cánula y como consecuencia la presencia de sangrado y menores volúmenes de colección se obtengan durante todo el espacio temporal de la perfusión (principalmente si se presentan antes o durante la estimulación), no se va a

obtener una buena liberación. Esto es indicativo de que en estas condiciones el tejido perfundido no responde como lo harían las células neuronales intactas.

IX.1 ANALISIS DE NIVELES BASALES.

Al observar las tres gráficas de las figuras 7 y 8 observamos como una perfusión sin accidentes y sin estimulaciones presenta una línea basal tanto de inmunoglobulinas como de proteínas con excepción de las zonas del inicio y del término de la perfusión. El propósito de realizar estas perfusiones fué con la finalidad de poder tener un parámetro que nos indicara cuales son las condiciones del tejido al estar en contacto con el líquido de perfusión y poder tomarlo como punto de partida para la realización de las perfusiones con estimulación y así poder diferenciar más fácilmente la respuesta del tejido a la estimulación como también cualquier alteración en el transcurso del proceso. En las gráficas correspondientes a las inmunoglobulinas se puede observar como hay una presencia continua de estas, por lo que se considera que se deben a la erosión que el líquido de perfusión esta ocasionando sobre el tejido, pero sin encontrarse niveles significativos que pudieran afectar directamente los niveles de proteínas basales, ya que las inmunoglobulinas tienen una naturaleza proteica podrían incrementar los niveles de proteínas en los perfusados, lo que nos estaría creando una gran cantidad de ruido que impediría hacer

correcta visualización de las proteínas presentes en los perfusados.

Ahora bien, si comparamos las lecturas de densidad óptica de las inmunoglobulinas con las lecturas mostradas en la figura 6 veremos que las lecturas (D.O. 490 nm = 0.15, aprox) corresponden a las diluciones de suero del orden de 50000 a 100000, en estas diluciones no fue posible detectar proteínas con los métodos empleados, como Lowry y Bradford, por lo que concluimos que la presencia de inmunoglobulinas en los perfusados no va a afectar la curva de liberación obtenida para las proteínas.

De los niveles basales de proteínas observados en las gráficas de liberación, cabe mencionar que su presencia puede obedecer a la erosión que el líquido de perfusión ejerce sobre el tejido y por lo tanto estar liberando proteínas integrales de membrana al medio de perfusión de forma continua y constante. Aunque también se cree que hay una liberación proteica de forma constante por parte de las células y que esta línea base puede ser producto de ello.

IX.2 PERFUSIONES CON LIBERACION.

Una vez que se observaron los patrones de liberación de las células en condiciones basales se procedió a realizar perfusiones que presentaran estimulación química. Lo primero que se hizo en

estas perfusiones, fue incluir un neurotransmisor exógeno como control de liberación. La sustancia que se empleó fue GABA tritiado la cual al ser una molécula fácilmente capturable por las células se va a almacenar en el interior de estas y posteriormente se liberará al darse en las células un proceso de despolarización y por ende liberación de sustancias. Como se puede ver en la figura 10, en la curva de liberación de 3H-GABA para C. putamen y G. pallidus se pueden ver fácilmente las fases por las que pasa este proceso de liberación. Posterior a la fase de administración del 3H-GABA viene una etapa de lavado continuo observandose claramente la tendencia de las curvas viendose alteradas únicamente en el momento en que se dió el estímulo y al momento de la lesión mecánica (control de liberación).

Para la cuantificación de proteínas en los perfusados con estimulación, se hizo por la técnica de Lowry y Bradford así como con el empleo de anticuerpos monoclonales.

La cuantificación de las proteínas liberables por los métodos de Lowry y Bradford fueron utilizados desde el principio del estudio de esta liberación (50, 52, 66), siendo de gran utilidad, pero presentando una serie de limitantes como pueden ser la interferencia con los iones presentes en el líquido de perfusión, la inespecificidad en la detección de proteínas, o sea detectan todas las proteínas presentes en los perfusados independientemente de su origen, pero una de las limitantes mayores de estas técnicas para este estudio fue su limitada capacidad de detectar cantidades muy pequeñas de proteínas en los perfusados. Este punto representó

uno de los mayores obstáculos a vencer, ya que se tuvo que adecuar el microensayo de manera que pudiera ser útil para la cuantificación de las proteínas escogiendo aquellas metodologías que dieron un mejor resultado y aún teniendo estas técnicas nos encontrábamos con que algunas veces no eran lo suficientemente sensibles para detectar la proteína presente por lo que muchas perfusiones se tuvieron que desechar debido a que no se encontraba nada, sin darnos cuenta de que en realidad las técnicas eran las que carecían de la sensibilidad necesaria.

En cuanto a la liberación de proteínas en presencia de un estímulo, estas se van a ver claramente en el perfil de liberación proteica de las figuras 12 y 13, en donde al aplicar el pulso de potasio este va a inducir la despolarización de la célula y con ello la liberación de las proteínas. Si comparamos los niveles de proteínas liberadas en condiciones basales con las liberadas con estimulación se puede ver claramente una diferencia significativa entre estas llegando incluso a ser un poco más del doble en el caso de *G. pallidus*, siendo esto una prueba de que no es un fenómeno provocado por un artefacto del sistema lo que ocasiona la liberación de proteínas, para corroborar más aún estos estudios Grenfield y col. (50) en experimentos previos dan un estímulo a la célula con K^+ y posteriormente dan otro estímulo con K^+ pero el líquido de perfusión va depletado de Ca^{++} , observando que bajo estas condiciones disminuye considerablemente la liberación de proteínas durante la segunda estimulación, deduciendo que es un fenómeno que obedece a un proceso de liberación por despolarización celular dependiente de Ca^{++} .

Para llevar a cabo el estudio de liberación de proteínas por medio de un ensayo inmunoenzimático (ELISA), se analizaron los anticuerpos monoclonales producto de los hibridomas resultantes de la fusión, siendo el anticuerpo monoclonal proveniente de la línea de hibridoma C3F3, el que dió una mayor afinidad por las proteínas solubles provenientes de vesículas sinápticas (fig. 15). Este anticuerpo fue el utilizado en el ensayo de la liberación de proteínas en los perfusados, y como se observa en las figuras 19 y 20 la respuesta del anticuerpo a las proteínas presentes fue mucho mayor que cuando se cuantifican por medio de ensayos como Lowry o Bradford con respecto a la línea base de liberación como se contempla en la figura 21, en donde al comparar de nuevo la liberación en *C. putamen* y *G. pallidus* y sobre todo la línea base con la liberación por estimulación es más considerable la diferencia.

La obtención de estos resultados hace evidente la gran utilidad del empleo de los ensayo inmunoenzimáticos para análisis que requieren de una buena capacidad de detección, así como una gran afinidad como lo demuestra la detección de inmunoglobulinas y de proteínas utilizando este método. Y se ve aún más favorecido si se conjuga con el empleo de anticuerpos monoclonales, los cuales van a potenciar la utilidad de esta técnica.

A su vez, el empleo de este anticuerpo en la detección de proteínas nos permite tener un mejor acercamiento al estudio de las mismas ya que va a presentar características que van a hacer más específica la detección, pero al mismo tiempo presenta una

limitante, que esta detección es meramente cualitativa y no cuantitativa como en el caso del metodo de Lowry y Bradford, pero aún asi con esta limitante ofrece todo un nuevo panorama de investigación ya que al combinarlo con otras técnicas como puede ser el Western Blot puede arrojar una gran cantidad de datos sobre estas proteínas y facilitar su estudio en el S.N.C. así como poder adicionar otros estudios, como son los de tipo histológico al estudio de estas proteínas.

X. CONCLUSIONES.

El desarrollo de técnicas de perfusión cada vez mas efectivas nos permiten un mejor acercamiento a los fenómenos de liberación de sustancias químicas por parte de las células nerviosas, pero es de suma importancia contar con las técnicas adecuadas para la evaluación de dichas sustancias.

El haber obtenido perfusiones libres de contaminación, tanto tisular como sérica, fue un paso relevante en el presente estudio ya que nos permitió considerar a esta técnica como la adecuada para poder abordar los procesos de liberación que deseamos estudiar.

Para poder evaluar la contaminación de las perfusiones obtenidas se contaba con la cuantificación de deshidrogenasa lactica como un marcador de lesión tisular, pero esto no era suficiente, sino que también era importante contar con técnicas que nos permitieran conocer la contaminación de los perfusados con material de origen sérico. La detección de inmunoglobulinas utilizando un ensayo inmunoenzimático nos permitio una correcta evaluación de la presencia de material sérico en los perfusados, por lo que se puede considerar como una técnica adecuada para la evaluación de la contaminación sérica en los perfusados.

Una vez obtenidos los perfusados y con la certeza de que no se encontraban contaminados, se requería una correcta cuantificación del material liberado. La utilización de métodos bioquímicos tradicionales para dicha evaluación fue una herramienta muy utilizada pero que presenta una serie de limitantes. El empleo de un anticuerpo monoclonal en el presente trabajo nos permitió tener un mejor acercamiento a la liberación del material proteico por parte de las células nerviosas ya que al compararlo con las técnicas bioquímicas de cuantificación se observó una clara diferencia, siendo que el anticuerpo monoclonal tiene una mayor precisión debido a que nos permite una mejor diferenciación entre la línea base y la liberación de dicho material, y a su vez una mayor especificidad por definición.

El desarrollo de técnicas cada vez más precisas y específicas son necesarias, para en un futuro se pueda lograr una mejor caracterización del material proteico liberable, es por esto que el empleo del anticuerpo monoclonal en el presente trabajo es un paso dentro de un proceso cuya finalidad es completar dicha caracterización de este material

Resumiendo, el empleo de un anticuerpo monoclonal contra proteínas liberables por células nerviosas, en conjunción con un ensayo inmunoenzimático, nos permitió una mejor evaluación de este material liberado.

Por lo anterior podemos concluir que se cumplieron los objetivos propuestos en este estudio.

XI. REFERENCIAS.

- 1.- Martin, J.H. Neuroanatomy. Text and Atlas. Elsevier, 1989. New York, N.Y. USA.
- 2.- Noback, C.R. y Demarest, R.J. Sistema Nervioso Humano. Fundamentos de Neurobiología. McGraw Hill, 1984. México, D.F., México.
- 3.- Pasantes-Morales, H. y Aréchiga, H. Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. UNAM, 1983. México, D.F., México.
- 4.- Patton, H.D., Fuchs, A.F. and Hille, B. Textbook of Physiology (Vol I) 21st edition, W.B. Saunders Company, 1989. Phil, P.A. USA.
- 5.- Banks, P. and Helle, K. (1965) The release of protein from stimulated adrenal medulla. Biochem. J. 97: 40C.
- 6.- Kirshner, N., Sage, J.J. and Smith, W.S. (1967) Mechanism of secretion from the adrenal medulla II. Release of catecholamines and storage vesicle protein in response to chemical stimulation. Mol. Pharmac. 3: 254-265.
- 7.- Viveros, O.H., Arqueros, L. and Kirshner, N. (1968) Release of catecholamines and dopamine-b-hidroxilase from the adrenal medulla. Life Sciences. 7: 609-618.
- 8.- Smith, A.D. Biochemical studies of the mecanism of release. En: Paton, D.M. (ed.), The release of catecholamines from adrenergic neurons. Pergamon Press, Oxford, England. 1979.
- 9.- Geffen, L.B., Livett, B.G. and Rush, R.A. (1969) Immunological localization of chromogranins in sheep sympathetic neurones, and their release by nerve impulses. J. Physiol. (Lond) 204: 58P-59P.
- 10.- De Potter, W.P., De Schaeppdryver, A.F., Moerman, E.S. and Smith, A.D. (1969) Evidence for the release of vesicle proteins together with noradrenaline upon stimulation of the spelnic nerve. J. Physiol. (Lond) 204: 102P-104P.
- 11.- Jimon, J.P., Bader, M.F. and Aunis, D. (1988) Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 1712-1716.
- 12.- Holleenger, E.G. and Niclasson, B.H. (1973) The release and molecular state of mammalian brain acetylcholinesterase. J. Neurochem. 20: 821-836.

- 13.- Krentzberg, G.W. and Kaiya, H. (1974). Exogenous acetylcholinesterase as tracer for extracellular pathways in the brain. *Histochemistry*. 42: 233-237.
- 14.- Davson, H. (1970) *Physiology of the cerebrospinal fluid*. Eds. J.A. Churchill, London, England.
- 15.- Svensmark, O. (1961) Cholinesterases in human spinal fluid and brain. *Acta. Physiol. Scand.* 52: 372-378.
- 16.- Silver, A. (1974) *The biology of cholinesterases*. Eds. North Holland, Amsterdam, Holland.
- 17.- Vigh, B. and Vigh-Teichman, I. (1973) Comparative ultrastructure of the cerebrospinal fluid-containing neurons. *Int. Rev. Cytol.* 35: 189-251.
- 18.- Chubb, I.W. and Smith, A.D. (1974) Increase concentration of an isoenzyme of acetylcholinesterase in rabbit cerebrospinal fluid after peripheal stimulation. *J. Physiol. (Lond)* 242: 118-120.
- 19.- Chubb, I.W. and Smith, A.D. (1975) Isoenzymes of soluble and membrane-bound acetylcholinesterase in bovine splanchnic nerve and adrenal medulla. *Proc. Roy. Soc. Lond. B191*: 245-261.
- 20.- 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.
- 21.- Jessen, K.P., Chubb, J.N. and Smith, A.D. (1978) Intracellular localization of acetylcholinesterase in nerve terminals and capillaries of the rat cervical ganglion. *J. Neurocytol.* 7: 145-154.
- 22.- Chubb, I.W., Hodgson, A.J. and White, G.H. (1980) Acetylcholinesterase hidrolyses substance P. *Neuroscience* 5: 2065-2072.
- 23.- Chubb, I.W., Greenfield, S.A. and Hogson, A.J. (1983) Is acetylcholinesterase the biggest "neuropeptide" of them all? *Neurosci. Lett. Sup. II*:56.
- 24.- Weston, J. and Greenfield, S.A. (1986) Release of acetylcholinesterase in the nigrostriatal pathway: relation to receptor activation and firing rate. *Neurosci.* 17(4): 1079-1088.
- 25.- Small, D.H., Ismael, Z. and Chubb, I.W. (1986) Acetylcho, inesterase hidrolyses chromogranin A to yield low molecular weight peptides. *Neurosci.* 19(1): 289-295.

- 26.- Winkler, H. and Smith, A.D. (1975) The chromaffine granule and the storage of catecholamines. In: Handbook of physiology, Sec 7, vol. VI, pp 321-339. Eds. H. Blanshko, G. Sayers and A.D. Smith.
- 27.- De Potter, W.P., Smith, A.D. and De Schaepdryer, A.F. (1970) Subcellular fractionation of splenic nerve: ATP, chromogranin A and dopamine-b-hydroxylase in noradrenergic vesicles. Tissue and Cell. 2: 529-546.
- 28.- Hortnagl, H., Hortnagl, A. and Winkler, H. (1969) Bovine splenic nerve. Characterization of noradrenaline-containing vesicles and other cell organelles by density gradient centrifugation. J. Physiol. (Lond) 205: 103-114.
- 29.- Smith, A.D., De Potter, W.P. Moerman, E.J. and De Schaepdryer, A.F. (1970) Release of dopamine-b-hydroxylase and chromogranin A upon stimulation of the splenic nerve. Tissue and Cell. 2: 547-568.
- 30.- Musick, J.R. and Hubbart, J.I. (1972) Release of protein from mouse motor nerve terminals. Nature. 237: 279-281.
- 31.- 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.
- 32.- Whittaker, V.P., Dowvall, M.L., Dowe, G.H.C., Facino, R.M. and Scotto, A. (1974) Protein of cholinergic synaptic vesicles from the electric organ of Torpedo: Characterization of a low molecular weight acidic protein. Brain Res. 75: 115-131.
- 33.- Musick, J.R. (1979) Correlated release of acetylcholine and proteins from the neuromuscular junction. Am. J. Physiol. 236: C232-C255.
- 34.- Younkin, S.G., Brett, R.S., Davey, B. and Younkin, L.H. (1978) Substances moved by axonal transport and released by nerve stimulation have a innervation-like effect on muscle. Science. 200: 1292-1295.
- 35.- Korr, J.M., Wilkinson, P.N. and Chornock, F.W. (1967) Axonal delivery of neuroplasmic components to muscle cells. Science. 155: 342-345.
- 36.- Appeltauer, G.S.L. and Korr, I.M. (1975) Axonal delivery of soluble, insoluble and electrophoretic fractions of neuronal protein to muscles. Exp. Neurol. 46: 132-146.
- 37.- Duffy, C., Teyler, T.J. and Shashoua, V.E. (1981) Long term potentiation in the hippocampal slice: Evidence for stimulated secretion of newly synthesized proteins. Science. 212: 1148-1151.

- 38.- Shashoua, V.E., Hesse, G.W. and Moore, B.W. (1984) Proteins of the brain extracellular fluid: Evidence for release of S-100 protein. *J. Neurochem.* 42: 1536-1541.
- 39.- Hesse, G.W., Holstein, R. and Shashoua, V.E. (1984) Protein release from hippocampus in vitro. *Brain Res.* 305: 61-66.
- 40.- Sandberg, M., Lamberger, A., Karlson, S.D. and Tirinilli, B. (1980) Potassium-stimulated release of axonally transported radioactivity from slices of rabbit superior colliculus. *Brain Res.* 188: 175-183.
- 41.- Sandberg, M., Lamberger, A., Jacobson, I. and Karlson, J.O. (1980) Role of calcium ions in the formation and release of low molecular-weight substances from optic nerve terminals. *Neurochem. Res.* 5(11): 1185-1198.
- 42.- Sweader, K.J. (1981) Environmentally regulated expression of soluble extracellular proteins of sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* 258: 4063-4070.
- 43.- Baundry, M., Bundman, M.C., Smith, E.K. and Lynch, G.S. (1981) Micromolar calcium stimulates proteolysis and glutamate binding in the rat synaptic membranes. *Science.* 212: 937-938.
- 44.- Kelly, R.B., Dutsch, J.W., Carlson, S.S. and Wagner, S.A. (1979) Biochemistry of neurotransmitter release. *Ann. Rev. Neurosci.* 2: 399-446.
- 45.- Ceccarelli, B. and Hurlbut, W.P. (1980) Ca⁺⁺ dependent recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell. Biol.* 87: 297-303.
- 46.- Sweadner, K.J. (1983) Post-translational modifications and evoked release of two large surface proteins of sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 3(12): 2504-2517.
- 47.- Barkai, A., Budek, M., Brown, D.L. and Fieve, R.R. (1978) Application of an improved cerebro-ventricular perfusion technique in the rabbit: Effects of pentobarbital or haloperidol on monoamine metabolites and proteins in the perfusates. *Neuropharmacol.* 17: 409-414.
- 48.- Barkai, A. (1979) Serotonin turnover in the intact rabbit brain: Relationship to extracellular proteins and modifications by pentobarbital or haloperidol. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 208: 44-48.
- 49.- Drucker-Colin, R.R., Spanis, C.W., Cotman, C.W. and McGough, J.L. (1975) Changes in proteins in perfusates of freely moving cats: Relation to behavioral states. *Science* 187: 963-965.

- 50.- Greenfield, S.A., Cheramy, A. and Glowinsky, J. (1983) Evoked release of proteins from central nervous system in vivo. *J. Neurochem.* 40: 1048-1057.
- 51.- Cheramy, A., Leviel, V. and Glowinsky, J. (1981) Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature.* 289: 537-542.
- 52.- Bayón, A., Solano, S., Anton, B., Castaño, I. and Diaz-Pontones, D. (1985) Push-Pull perfusions studies on the in vivo release of proteins, enzymes, and the neuroactive peptides-enkephalines from the rat brain. pp: 69-93 In: *In vivo perfusion and release of neuroactive substances.* Eds.: Bayón, A. and Drucker-Colin, R. Academic Press.
- 53.- Gaddum, J.H. (1961) Push-Pull cannulae. *J. Physiol.* 155: 1P-2P.
- 54.- Feldberg, W. and Sherwood, S.L. (1953) A permanent cannula for intraventricular injections in cats. *J. Physiol.* 120: 3P-4P.
- 55.- Feldberg, W. (1986) History of in vivo analysis of brain functions elicited from its inner and outer surfaces. In: *Neurochemical analysis of the conscious brain: Voltametry and "push-pull" perfusion.* Myers, R.D. and Knott, P.T. (Eds.) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 473: 1-20.
- 56.- Fox, R.H. and Hilton, S.M. (1958) Bradykinin formation in human skin as a factor in heat vasodilatation. *J. Physiol.* 142: 219-232.
- 57.- Myers, R.D. (1986) Development of "push-pull" systems for perfusion of anatomically distinct regions of the brain of the awake animal. In: *Neurochemical analysis of the conscious brain: Voltametry and "push-pull" perfusion.* Myers, R.D. and Knott, P.J. (Eds.) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 473: 21-41.
- 58.- Gaddum, J.H. (1962) Substances released in nervous activity. In: *Pharmacological analysis of central nervous action.* W.D.M. Paton, and Lindgren, P. (Eds.) Pergamon Press, London. 1-6.
- 59.- Philippu, A. (1984) Use of "push-pull" cannulae to determine the release of endogenous neurotransmitters in distinct brain areas of anaesthetized and freely moving animals. In: *Measurement of neurotransmitter release in vivo.* Marsden, C.A. (Eds.) Academic Press, U.S.A.
- 60.- Delgado, J.M.R. and Rubinstein, L. (1964) Intracerebral release of neurohumors in unanesthetized monkeys. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 150: 530-546.
- 61.- Delgado J.M.R. (1966) Intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 161: 442-462.

- 62.- Myers, R.D. and Sharpe, L.G. (1968) Chemical activation of ingestive and other hypothalamic regulatory mechanisms. *Physiol. Behav.* 3: 987-995.
- 63.- Barton, A.J., Blight, J. and Sharman, D.F. (1969) Improved techniques for the chronic cannulation of the lateral cerebral ventricle and the cisterna magna of the Welsh Mountain Sheep. *J. Physiol.* 200: 25P-27P.
- 64.- Myers, R.D. (1972) Methods for perfusing different structures of the brain. In: *Methods in Psychobiology*. Myers, R.D. (Ed.) Academic Press, London. 2: 169-211.
- 65.- Philippu, A., Przuntek, H. and Roesberg, W. (1973) Superfusion of the hypothalamus with gamma-amino butyric acid: Effect on the release of noradrenaline and blood pressure.
- 66.- Bayón, A. and Drucker-Colin, 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*. Bayón, A. and Drucker-Colin, R.R. (Eds.) Academic Press, Orlando, U.S.A. 1-7.
- 67.- Bayón, A., Anton, B., Solano, S., Sierra-Honigmann, A.M. and Sordo, M. (1988) Sondas de perfusión intracerebral in vivo -un nuevo diseño y su evaluación-. *Salud Mental.* 11: 21-25.
- 68.- Tilson, H.A. and Sparber, S.B. (1972) Studies on the concurrent behavioral and neurochemical effects of psychoactive drugs using the "push-pull" cannulae. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 181: 387-398.
- 69.- Veale, W.L. and Myers, R.D. (1971) Emotional, Behaviour, arousal and sleep produced by sodium and calcium ions perfusion within the hypothalamus of the cat. *Physiol. Behav.* 7: 601-607.
- 70.- Philippu, A., Roesberg, W. and Przuntek, H. (1973) Effects of adrenergic drugs on pressor responses to hypothalamic stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 278: 373-386.
- 71.- Chase, T.N. and Kopin, I.J. (1968) Stimulus-induced release of substances from olfactory bulb using the "push-pull" cannulae. *Nature.* (London). 217: 466-467.
- 72.- Myers, R.D. and Mora, F. (1977) In vivo neurochemical analysis by "push-pull" perfusion of the mesocortical dopaminergic system of the rat during self-stimulation. *Brain Res. Bull.* 2: 105-112.

- 73.- Nieouillon, A., Cheramy, A. and Glowinski, J. (1977) An adaptation of the "push-pull" cannulae method to study the in vivo release of 3H-dopamine synthesized from 3H-tyrosine in the cat caudate nucleus: Effects of various physical and pharmacological treatments. *J. Neurochem.* 28: 819-828.
- 74.- Moore, K.E. (1986) Drug-induced changes in the efflux of dopamine and serotonin metabolites from the brains of the freely moving rats. In: *Neurochemical analysis of the conscious brain: Voltametry and "push-pull" perfusion.* Myers, R.D. and Knott, P.J. (Eds.) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 473: 303-320.
- 75.- Phillis, J.W. and York, D.H. (1968) Acetylcholine release from feline thalamus. *J. Pharm. Pharmacol.* 20; 476-478.
- 76.- McLennan, H. (1965) The release of dopamine from the putamen. *Experientia* 21: 725.
- 77.- Myers, R.D. and Beleslin, D.B. (1970) The spontaneous release of 5-hydroxytryptamine and acetylcholine within the diencephalon on the unanaesthetized rhesus monkey. *Exp. Brain. Res.* 11: 539-552.
- 78.- Bayón, A. (1987) In vivo and in vitro studies on peptide release. En: Boulton, A., Baker, G. y Pittman, Q. (Eds) *Neurmethods. Vol. 6 Peptides.* Human Press, N.Y., USA pag 113-142.
- 79.- Raiteri, M., Angelini, F. y Levi, G. (1974) A simple apparatus for studying the release of neurotransmitters from synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 25; 411-414.
- 80.- Redburn, D.A., Biela, J., Shelton, D. y Cotman, C.W. (1975) Stimulus-secretion coupling in vitro: A rapid perfusion apparatus for monitoring efflux of transmitter substances from tissue samples. *Anal Biochem.* 67: 268-278.
- 81.- Jessell, T.M. (1978) Substance P release from the rat substantia nigra. *Brain Res.* 151: 469-478.
- 82.- Marien, M., Brien, J., and Jhamandas, K. (1983) Regional release of 3H-dopamine from rat brain in vitro: Effects of opioids on release induced by potassium, nicotine and L-glutamic acid. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 61: 43-60.
- 83.- Leusen, I. (1950) The influence of calcium, potassium and magnesium ions in cerebrospinal fluid on vasomotor system. *J. Physiol. (London)* 110: 319-329.
- 84.- Battacharya, B.K. and Feldberg, W. (1958) Perfusion of cerebral ventricles: Assay of pharmacologically active substances in the effluent from the cisterna and the aqueduct. *Brit. J. Pharmacol.* 13: 163-174.

- 85.- Pappenheimer, J.R., Heisey, S.R., Jordan, E.F. and Downer, J.C. (1962) Perfusion of the cerebral ventricular systems in unanesthetized cats. *Am. J. Physiol.* 203: 763-774.
- 86.- Mc Lennan, H. (1964) The release of acetylcholine and 3-hydroxytryptamine from the caudate nucleus. *J. Physiol.* (London) 174: 152-161.
- 87.- Myers R.D. and Chinn, C. (1973) Evoked release of hypothalamic norepinephrine during thermoregulation in the cat. *Am J. Physiol.* 224: 230-236.
- 88.- Dietl, H. and Philippu, A. (1979) In vivo release of endogenous GABA in the cat hypothalamus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 308: 143-147.
- 89.- Dietl, H., Eisert, A., Kraus, A. and Philippu, A. (1981) The release of endogenous catecholamines in the cat hypothalamus is affected by spinal transection and drugs which changes the arterial blood pressure. *J. Auton. Pharmacol.* 1: 279-286.
- 90.- Bartholini, G. (1976) Differential effect of neuroleptic drugs on dopamine turnover in the extrapyramidal and limbic system. *J. Pharm. Pharmacol.* 28: 429-433.
- 91.- Van der Gugten, J. and Slangen, J.L. (1977) Release of endogenous catecholamines from the rat hypothalamus in vivo related to feeding and other behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 7: 211-219.
- 92.- Puizillout, J.J., Gaudin-Chazal, G., Daszuta, A., Seyfritz, N. and Ternaux, J.P. (1979) Release of endogenous serotonin from "encéphale isolé" cats. II Correlations with raphe neuronal activity and sleep and wakefulness. *J. Physiol.* (Paris) 75: 531-537.
- 93.- Yaksh, T.L. and Yamamura, H.I. (1974) Factors affecting performance of the "push-pull" cannula in the brain. *J. Appl. Physiol.* 37: 428-434.
- 94.- Honchar, M.P., Hartman, B.K. and Sharpe, L.G. (1979) Evaluation of in vivo brain site perfusion with the "push-pull" cannulae. *Am. J. Physiol.* 236: R48-R56.
- 95.- Redgrave, P. (1984) Technical issues associated with "push-pull" perfusion in unanesthetized animals. In: Measurement of neurotransmitter release in vivo. Marse, C.A. (Ed) *Ann N.Y. Acad Sci Vol. 482.* pag 145-162.
- 96.- Paxinos, G. and Watson, C. (1982) *The rat brain.* Academic Press, North Ryde, Australia.
- 97.- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

- 98.- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 99.- Engvall, E. (1977) Quantitative enzyme immunoassay (ELISA) in microbiology. *Med. Biology.* 55: 193-200.
- 100.-Engvall, E. (1980) Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Meth. Enzymol.* 70: 419-439.
- 101.-Engvall, E. and Clark, B.R. (1982). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Theoretical and Practical Aspects. In: *Enzyme-Immunoassay*. Maggio, E.T. (Ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- 102.-Engvall, E. and Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8: 871-875.