

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

Philippe Leff*
Benito Antón*

Summary

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

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

Resumen

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

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

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

Introducción

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

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

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

¹ Dedicado a la memoria del Dr. Alejandro Bayón Caso

inducida por la despolarización química con una alta concentración del ion K⁺ (50 mM) de sustancias proteicas de alta masa molecular con actividades enzimáticas como las proteínas acetilcolinesterasa (AChE) y la deshidrogenasa láctica (DHL). Estos hallazgos iniciales mostraron que la liberación de estas enzimas, inducida por la despolarización neuronal, fue dependiente de la presencia del ion Ca⁺⁺ en el medio de perfusión, al igual que la liberación inducida por la despolarización química con alto potasio de transmisores peptídicos y no peptídicos. Estos resultados permiten, por lo menos *a priori*, plantear la existencia hipotética de mecanismos neuronales de liberación de material protéico de alto peso molecular, similares a los que son empleados para la liberación de transmisores clásicos de naturaleza peptídica y no peptídica (v.g., exocitosis). En complemento a esta propuesta hipotética, también sería plausible proponer la existencia potencial de un nuevo grupo de mensajeros químicos, sustancias que serían liberadas por la despolarización neuronal de naturaleza protéica y de alto peso molecular. Este fenómeno de secreción protéica neuronal tendría importantes implicaciones en la comunicación química celular del sistema nervioso, ya que la secreción fisiológica de macromoléculas al espacio interneuronal pudiera representar una forma adicional de regulación de la neurotransmisión sináptica por proteínas neuromoduladoras de bajo recambio metabólico con acciones fisiológicas prolongadas. No obstante estos datos experimentales iniciales, que apoyan la existencia de material protéico cuya secreción sería incrementada hacia el espacio extracelular por la despolarización neuronal, así como las posibles implicaciones funcionales que dicho fenómeno secretorio tendría en el contexto de la fisiología nerviosa, hay datos experimentales controversiales recientes que sugieren que una proporción importante del incremento del material protéico en el espacio extracelular nervioso, que es inducido por la despolarización química con alto potasio, no es de origen neuronal (Jenssen y col., 1978), sino más bien de origen plasmático, debido a un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos por la despolarización química (Delepine y Aubineu, 1997). En este contexto, se ha propuesto que este último mecanismo favorecería la filtración del material protéico del espacio vascular al compartimiento extracelular del tejido nervioso. Por lo tanto, para resolver esta controversia, en el presente trabajo decidimos identificar y asegurar el sitio celular de origen de la secreción inducida por despolarización con alto potasio de material protéico de alto peso molecular. Estos últimos estudios los llevamos a cabo por medio de un abordaje experimental que implica la incorporación *in vivo* del aminoácido Metionina, marcado con el isótopo ³⁵S. Este aminoácido ha sido rutinariamente empleado para identificar y caracterizar molecularmente, en diversas preparaciones biológicas, una amplia gama de moléculas bioactivas de alto y bajo peso molecular (v.gr., fracciones isoenzimáticas de pepsinógeno gástrico; la proteinasa inhibidora de la α₂ macroglobulina del epitelio corneal; nuevos mensajeros peptídicos en el tejido cerebral de invertebrados marinos; el procesamiento diferencial y la estabilidad

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

Objetivos

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

Materiales y métodos

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

Se emplearon ratas Sprague-Dawley de 300-350 gr, las cuales fueron anestesiadas con una mezcla de Fluotano/CO₂/O₂ (1.5 % /90 % / 5 %) para la implantación quirúrgica de una cánula-guía (18 ga) colocada a 1 mm por arriba del estriado. La recuperación post-quirúrgica de los animales fue invariablemente de una semana. Después de este intervalo de recuperación, los animales se emplearon para la inyección del precursor radiactivo. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas para la implantación de la cánula-guía y la inserción de la cánula de inyección fueron tomadas del atlas del cerebro de la rata de Watson y Paxinos (1995).

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

Para inyectarles la ³⁵S-Metionina, las ratas implantadas con la cánula-guía fueron anestesiadas con una mezcla de Fluotano/CO₂/O₂, fijadas estereotáxicamente y sujetas a una inyección única en el núcleo estriado de 10 µCi/3 µl/15 min de ³⁵S-Metionina (1180 Ci/mmol, Amersham). La inyección del precursor radiactivo se

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

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

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

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

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

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

Sistema de perfusión intracerebral in vivo

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

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

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

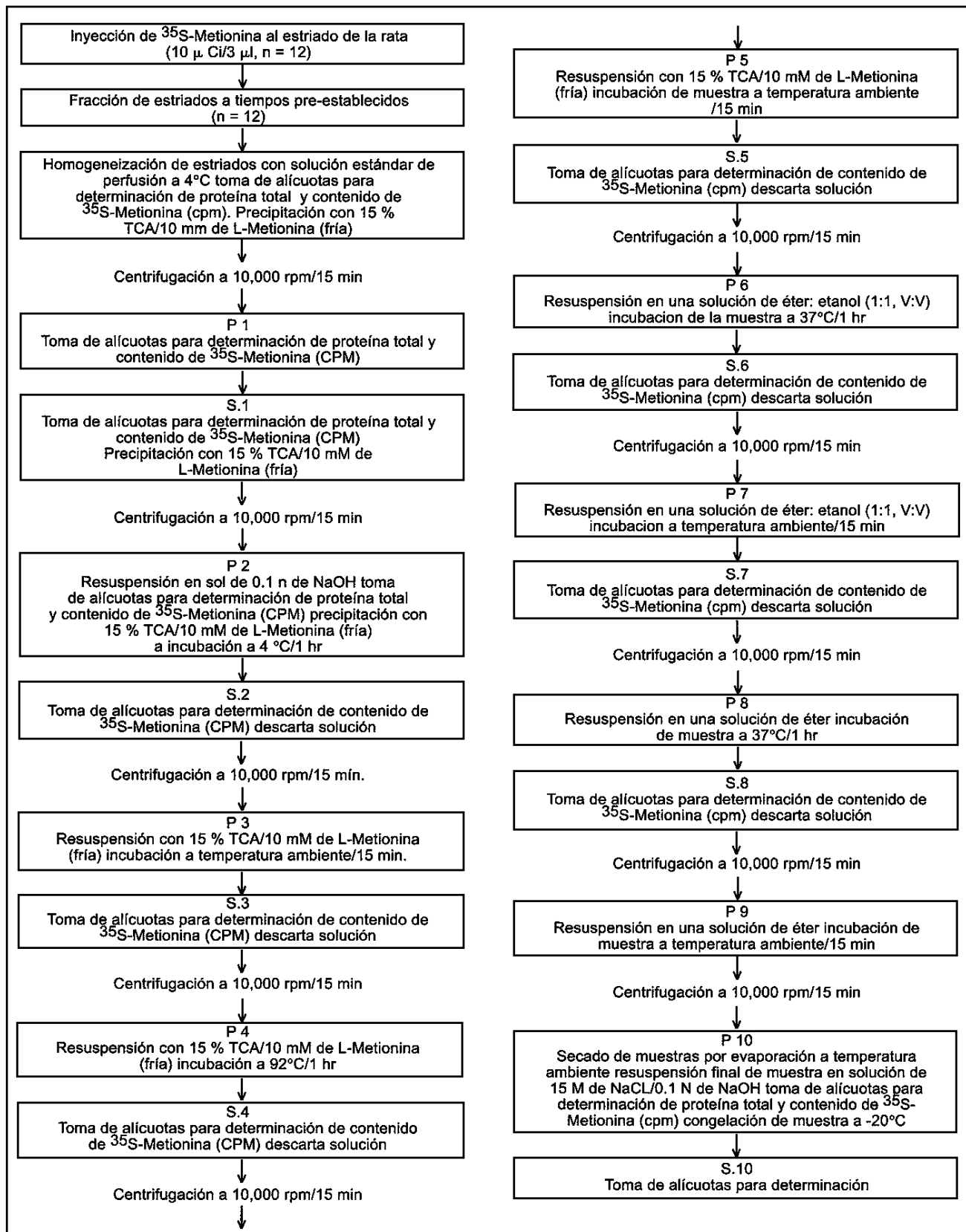
El material protéico marcado con el precursor radiactivo, recogido en fracciones de perfusado bajo condiciones experimentales de perfusión basal (no despolarización) y de perfusión despolarizante con la alta concentración de potasio, fueron procesados y sujetos a los mismos métodos de cuantificación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

Resultados

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

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

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

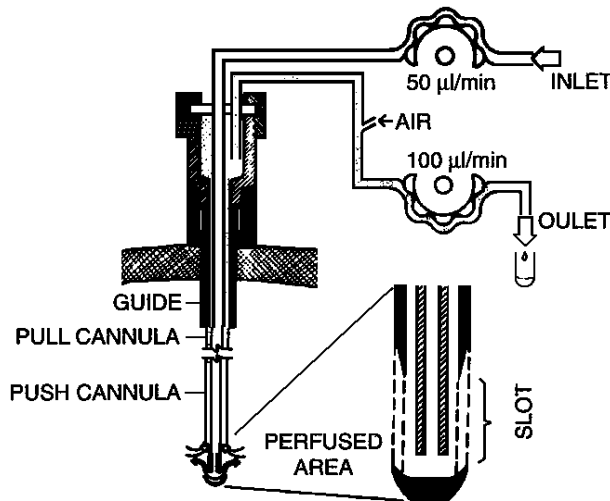


jido estriato-palidal, se observó a las 8 horas posteriores a la inyección local de este precursor en el estriado de la rata. La determinación del tiempo óptimo de in-

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

DIAGRAMA 2

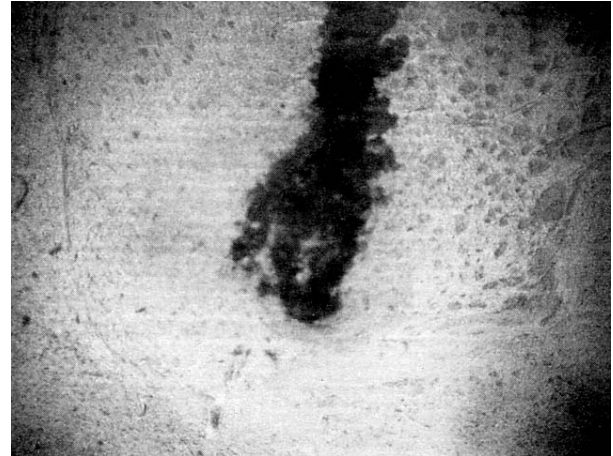
Diagrama de sistema de perfusión *push-pull*. El diseño básico de la cánula de perfusión es la de Gaddum-Myers (izq). La tubería de infusión (*inlet*, blanco) y de extracción (*outlet*, punteado) están formadas por dos tubos concéntricos de acero inoxidable que forman el largo de la cánula. Ambas tuberías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



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

DIAGRAMA 2a

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



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

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

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

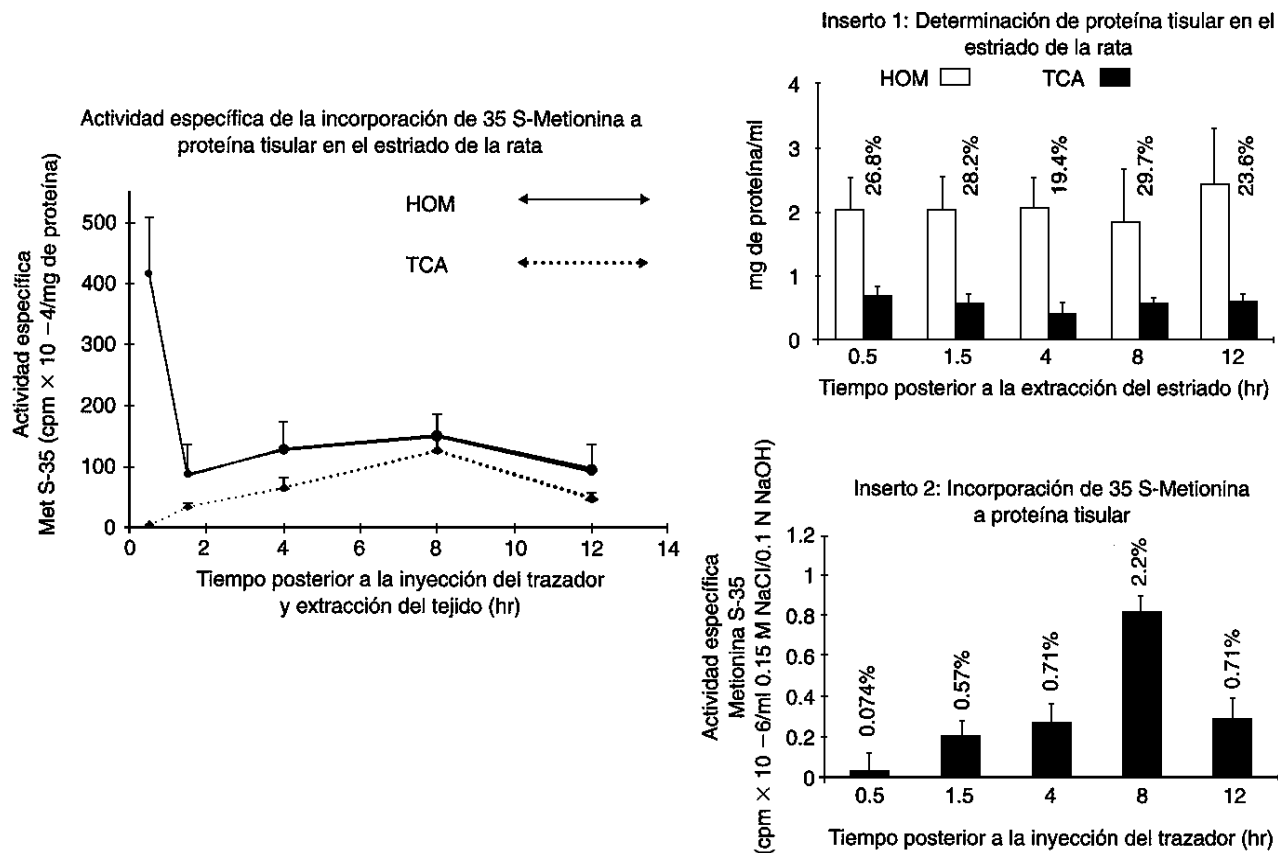


Figura 1. Actividad específica de ^{35}S -Metionina en secciones de tejido estriatal homogeneizado y precipitado con TCA. Las ratas Sprague-Dawley fueron expuestas a un pulso único de ^{35}S -Metionina (10 $\mu\text{Ci}/3 \text{ ul}/15 \text{ min}$). Los estriados de las ratas fueron extraídos a los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

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

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

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

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

CUADRO 1

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

CUADRO 1 (continuación)

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

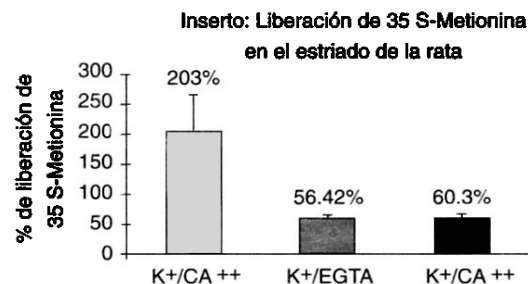
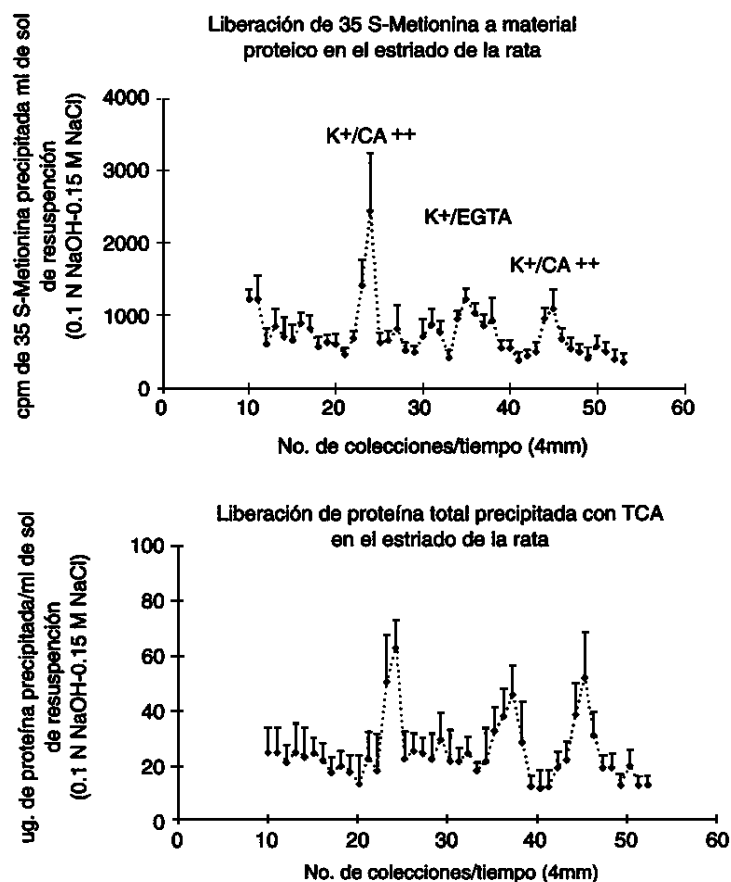


Figura 2. Liberación de metionina S-³⁵ incorporada a material protéico precipitado con TCA en el estriado de la rata. Las ratas Sprague-Dawley fueron implantadas esterotáxicamente con una cánula guía. Posteriormente las ratas Y1 fueron inyectadas individualmente a la región anatómica del caudo-putamen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

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

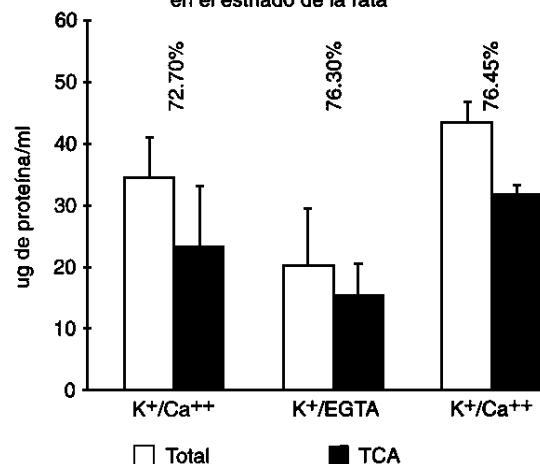


Figura 3. Valores de los incrementos netos de proteína liberada por despolarización dependiente de la presencia de calcio extracelular. Las ratas Sprague-Dawley fueron perfundidas en el área del caudo-putamen. Nótese el importante incremento (80 % sobre el valor basal) en la secreción del material protéico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

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

Discusión

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

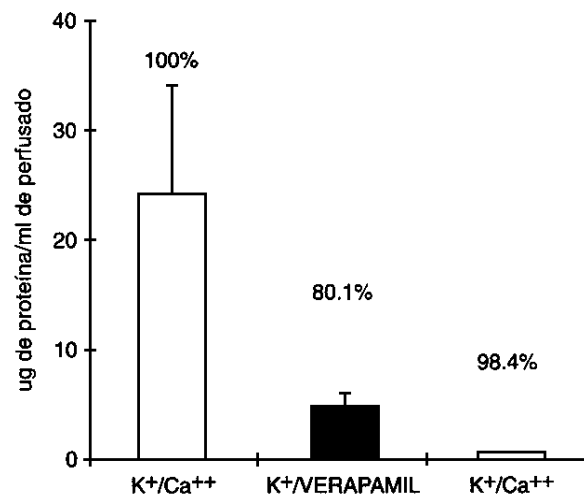


Figura 4. Valores de los incrementos netos de proteína total liberada por despolarización en presencia del verapamil. Las ratas Sprague-Dawley fueron perfundidas en el área del caudo-putamen. La infusión de líquido de perfusión con una concentración despolarizante de 50 mM del ion k⁺ en presencia de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

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

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

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

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

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

Conclusiones

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

Agradecimientos

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

REFERENCIAS

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

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

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

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