

ACTUALIZACION POR TEMAS

Proteínas y enzimas como posibles mensajeros en la comunicación química interneuronal. Parte II

Philippe Leff*
Benito Anton*

Summary

Chemical transmission in vertebrate and non vertebrate species is based on the release of a large number of small to medium sized molecules which include a vast number of peptide and non peptide transmitters. In general, all these substances affect their targeted neurons by generating either postsynaptic excitatory or inhibitory electrical signals as responses on postsynaptic targeted neurons. During the past decades several reports have revealed that high molecular weight proteins, such as acetylcholinesterase, neurotrophins and several non characterized protein-like molecules could be able to generate specific biological actions in neurons affecting brain transmission in postsynaptic targeted neurons.

Key words: Proteins, enzymes, release, neurotrophins, depolarization, neuron transmission and basal ganglia.

Resumen

La neurotransmisión química en el cerebro de los mamíferos y en el de las especies no mamíferas, se caracteriza por la liberación neuronal de una amplia gama de moléculas mensajeras, que incluyen neurotransmisores de naturaleza peptídica y no peptídica que poseen la capacidad de facilitar o inhibir la transmisión sináptica mediante la generación de señales eléctricas de tipo excitatorio o inhibitorio. Además de estas sustancias bioactivas, también hay un extenso grupo de macromoléculas de naturaleza protéica que participan en la comunicación química neuronal, generando y regulando diversas respuestas biológicas en el sistema nervioso.

Palabras clave: Proteínas, enzimas, neurotrofinas, transmisión, liberación, despolarización, neurona, ganglios basales.

1. La acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa

a) Introducción

La acetilcolinesterasa representa la proteína masa estudiada e investigada dentro del amplio espectro de ma-

cromoléculas identificadas, aisladas, clonadas y caracterizadas molecularmente tanto en especies de vertebrados (Randall, 1994) como de invertebrados (Lewis y col., 1982; Toutant, 1989; Meyer y col., 1998). La acetilcolinesterasa (ACHE; E.C. 3.1.1.7) es la enzima que interviene en la hidrólisis del neurotransmisor, la acetilcolina (Ach), y tanto ésta como la butirilcolinesterasa (BuChE; E.C. 3.1.1.8) se encuentran en los tejidos (membranas plasmáticas) y en los líquidos biológicos (plasma y LCR) como polímeros, en dos conformaciones estructurales, y como *proteínas amfilílicas simétricas*, formadas por la asociación de distintas subunidades catalíticas globulares: G₁, G₂, G₄, las cuales son extraídas con soluciones amortiguadoras de baja fuerza iónica o con detergentes iónicos cuando se encuentran insertadas o ancladas en membranas plasmáticas por medio de un glucolípido que contiene fosfatidilinositol asociado a un fragmento peptídico hidrofóbico de 20 kDa (Fuentes y col., 1988; Inestrosa y Perelman, 1989; Spinedi y col., 1993), cuya síntesis y transcripción diferencial parece ser regulada por péptidos pequeños (v.g., Glicil-L-Glutamina) (Koelle, 1988). Estas formas globulares se encuentran ancladas en proteínas de colágena de la matriz extracelular por medio de proteoglicanos extracelulares, conformando proteínas más complejas (Inestrosa y Perelman, 1989; Toutant, 1989), esto es, estructuras *protéicas asimétricas* del tipo A₄, A₆, A₁₂ (Brimijoin, 1983; Fadic e Inestrosa, 1989; Toutant y col., 1990; Saez-Valero y col., 1993), mismas que parecen ensamblarse en el aparato de Golgi (Rotundo, 1984) (figuras 1 y 2), cuya agregación en terminales sinápticas parece inducir la agregación y expresión del ACh-R en la unión neuromuscular (Wallace y col., 1985). Asimismo, se ha demostrado que las diferentes formas globulares (v.g., 4S, G₂, 10S, G₄) tanto de acetilcolinesterasa como de butirilcolinesterasas (3S, 10S), se encuentran ampliamente distribuidas en diversas áreas neuroanatómicas del cerebro adulto y fetal de los mamíferos (Planas y col., 1994; Schlagger y col., 1994; Yao y Godfrey, 1998; Darvesh y col., 1998), conjuntamente con la expresión inmunoreactiva de péptidos bioactivos y factores de crecimiento (v.g., NGF)

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

(Peterson y col., 1994), incluyendo el cerebro humano (Mesulam y Geula, 1994), o el tejido neuronal en regeneración (Pokay y Grant, 1984; Engel y Kreutzberg, 1986; Layer y col., 1987; Millar y Chubb, 1987; Brimijoin y col., 1990; Geula y col., 1993; Pogorelov y col., 1993). Particularmente se ha localizado la expresión de diferentes isoformas de AChE en las terminales sinápticas neuronales (Rotundo y Carbonetto, 1987) y en vesículas secretorias en la glándula adrenal (Gratzl y col., 1981) donde previamente se había detectado su liberación inducida en perfusados (con alta concentración de K⁺) en presencia de Ca⁺⁺ externo (Chubb y Smith, 1975). En el tejido nervioso se ha colocalizado la expresión de la enzima, con el sistema neuronal de captura de ACh a nivel de la presinapsis (Raiteri y col., 1986). Bajo este contexto se ha demostrado que la expresión celular de las diferentes isoformas de las colinesterasas, está mediada por diferentes formas de excisión (*splicing*) de múltiples RNAm (Schumacher y col., 1988) que codifican las diferentes isoformas celulares de AChE, cuyos transcritos parecen provenir de una sola copia genómica (Schumacher y col., 1988; Rotundo y col., 1988; Li y col., 1991). La distribución

de los RNAm que codifican la diversidad de isoformas de AChE, han permitido revelar, mediante ensayos de hibridación *in situ*, la amplia distribución de este mensajero en el tejido neuronal de los mamíferos superiores (v.g., mono rhesus y humano) (Landwehrmeyer y col., 1993) y en las líneas tumorales de los seres humanos (Karpel y col., 1994). Se ha demostrado que la forma predominante de la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa, que circulan en los líquidos biológicos, es la forma globular G₄ en una relación entre ambas moléculas de 1:0.5, respectivamente (Attack y col., 1987). Indistintamente, se ha podido demostrar *in vitro* la ruta de secreción de las isoformas de AChE, su inserción en la membrana plasmática en el cultivo de las células musculares (Rotundo y Fambrough, 1980; Rossi y Rotundo, 1992), la inducción de la síntesis de la enzima en las células musculares mediante péptidos bioactivos secretados por las motoneuronas (v.g., Calcitonin gene related-peptide, CGRP) (Choi y col., 1998), la secreción fisiológica basal estimulada (50 mM de K⁺ o carbacol) de AChE (G₄) conjuntamente con la liberación inducida de NE a partir del cultivo primario de la línea tumoral adrenomedular, PC12, en presen-

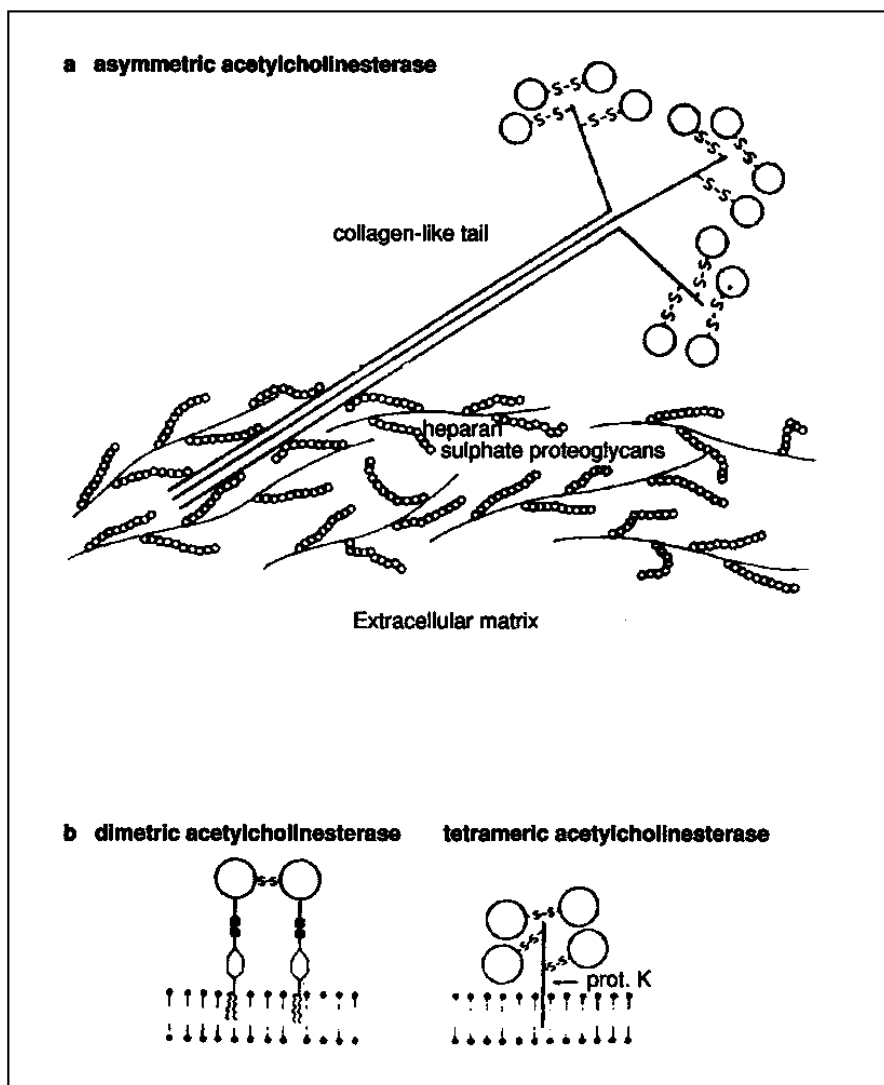


Figura 1. Representación esquemática de las diferentes formas moleculares de la AChE y su anclaje a las membranas plasmáticas.

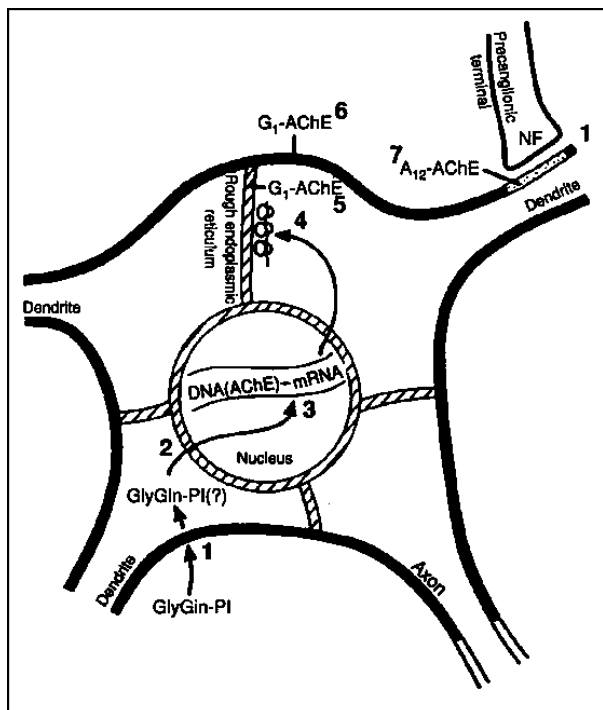


Figura 2. Hipótesis sobre la regulación de la síntesis de AChE por el dipéptido Gly-Gln en las neuronas adrenérgicas del ganglio cervical superior. El dipéptido Gly-Gln, en combinación con un factor neurotrófico (PI) liberado de la terminal presináptica, atraviesa la membrana plasmática (1) y la membrana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

cia de inhibidores impermeables de esterasas (v.g., paroxón, fosfolina) (Mizobe y col., 1984; Schweitzer y Kelly, 1985; Schweitzer, 1993), donde se ha podido demostrar la presencia de distintas isoformas de AChE en los gránulos cromafines (Bon y col., 1990).

b) Secreción neuronal de Acetilcolinesterasa (AChE)

Las observaciones iniciales revelaron que la AChE y la colinesterasas inespecíficas (ChE) unidas a membranas (Silver, 1974) podían ocurrir en formas solubles (Chubb y Smith, 1975, a y b). En estudios anteriores se había confirmado que la AChE se encontraba en espacios extracelulares tanto de la placa neuromuscular como del sistema nervioso central (Kasa, 1968; Kreutzberg y Töth, 1974; Kreutzberg y Kaiya, 1974), aunado al hecho de que sólo una tercera parte de la fracción de AChE intracelular recién sintetizada es incorporada a las membranas plasmáticas (Rotundo y Famborough, 1980). Estos antecedentes, conjuntamente con la observación de la presencia de colinesterasas

en el LCR (Plattner, 1930; Davson, 1970), permitió caracterizar por estudios electroforéticos, la existencia de 5 fracciones solubles isoenzimáticas de AChE, resultando que una sola iso especie enzimática (la de baja movilidad electroforética) era capaz de liberarse en forma fisiológica del tejido neuronal (Chubb y Smith, 1975) como lo sugerían diversos autores (Yaksh y col., 1973), ya que el plasma sólo contiene colinesterasas inespecíficas (Chubb y Smith, 1975) por lo que su origen a partir de este compartimento era dudoso. Mediante la estimulación eléctrica del tejido nervioso periférico, Chubb y Smith indicaron por vez primera que la fracción isoenzimática V aumentaba considerablemente en el LCR, posteriormente a la estimulación nerviosa (Chubb y Smith, 1974; Fuenmayor y col., 1976), y que ésta se co-liberaba con ACh (Chubb y col., 1976), misma que era liberada bajo estimulación química del tejido adrenal con una alta concentración de K^+ y Ca^{++} presente en el medio extracelular, observándose que las proteínas marcadoras del compartimento intracelular LDH, no se incrementaban después del proceso de estimulación (Chubb y Smith, 1975b). Más aún, estudios *in vitro* permitieron corroborar que la liberación de AChE posterior a la estimulación eléctrica despolarizante de la preparación nervio frénico-hemidiafragma era dependiente de Ca^{++} e inhibida por Mg^{++} (Skau y Brimijoin, 1978). Asimismo, que la administración sistémica del clorpromazina (fármaco utilizado para aumentar la actividad colinérgica endógena) producía un incremento sustancial fronto-caudal en la actividad de esta enzima en el LCR de los mamíferos, datos que apoyaban el posible origen neuronal de la liberación de la AChE (Bareggi y Giacobanni, 1978). Este incremento ventrículo-cisternal de AChE inducido por este fármaco, es bloqueado por la atropina. Estos datos permiten sugerir que las neuronas contenidas en las áreas profundas del cerebro, como las células dopaminérgicas de la sustancia nigra (*pars compacta*) sensibles a la acción de estos fármacos, podían ser las responsables de la diferente concentración de AChE determinada en el LCR (Greenfield y col., 1978).

Estos estudios, que abordaban el posible origen neuronal de la secreción de AChE, fueron ampliados mediante la implementación de la técnica de perfusión intracerebral *push-pull*. Este procedimiento permitió localizar con mayor facilidad las áreas cerebrales de donde pudiese ocurrir la secreción fisiológica de la AChE. Inicialmente, se reportó que la estimulación eléctrica del estriado y la sustancia nigra, inducía un incremento significativo de los niveles basales de AChE (no de colinesterasas inespecíficas) en el LCR (Greenfield y Smith, 1979). Mediante la inserción intracerebral de cánulas simultáneas en el núcleo caudado y en la sustancia nigra, Greenfield y col., demostraron la liberación espontánea e inducida de AChE (mediante la infusión local de medios de perfusión, conteniendo altas concentraciones del ión K^+ , en ambas regiones subcorticales (Greenfield y col., 1980). Estos resultados confirmaban que la liberación estriato-nigral de AChE está estrechamente relacionada con el sistema neuronal dopaminérgico donde, en apoyo a las observaciones inmunohistoquímicas, se ha demostrado que estas neuronas, además de contener DA, contienen AChE

(Butcher y Woolf, 1982) localizada en las membranas presinápticas de las fibras aferentes nigro-estriales (Lehman y Fibigier, 1978).

Con el fin de determinar el grado de participación del sistema nigro-estriatal en la liberación de AChE, los mismos autores reportaron que después de la lesión del tracto dopaminérgico nigro-estriatal con 6-hidroxidopamina, la liberación espontánea de la isoenzima se reducía dramáticamente en un 70 % del valor control promedio en el estriado de los gatos, conjuntamente con la ausencia de una respuesta de liberación inducida de la misma por un alto K⁺ y una depleción del contenido tisular de DA en la sustancia *nigra*. Esto apoya y refuerza que la AChE es liberada de las terminales presinápticas a partir de las fibras aferentes dopaminérgicas (Greenfield y col., 1983 a y b). Además, la liberación espontánea de AChE y DA se ve incrementada en el estriado y en la sustancia *nigra* ipsilateral cuando se infunde localmente fármacos agonistas dopaminérgicos como la amfetamina, en contraposición con la determinación de la liberación espontánea de ChE en ambas estructuras (Leviel y col., 1979; Greenfield y Shaw, 1982). Más aún, la administración local con TTX (bloqueador selectivo de canales de Na⁺ y, por ende, del impulso nervioso) no reduce significativamente la liberación espontánea de la isoenzima y DA en la sustancia *nigra*, más la liberación de ambas moléculas se incrementa con la presencia de un alto K⁺ (50 mM) y Ca⁺⁺ en el medio de perfusión, lo que sugiere el origen dendrítico de la liberación de la AChE (Greenfield, 1984a) en apoyo a las observaciones inmunohistoquímicas, en las que se ha observado la translocación de AChE del soma neuronal a las dendritas, que es secretada al medio extracelular a partir de las motoneuronas de los mamíferos, donde es depositada en la membrana basal de los capilares adyacentes (Kreutzberg y Töth, 1974). Por lo tanto, la liberación de la AChE parece no sólo derivarse de terminales presinápticas de axones aferentes dopaminérgicos en el estriado, sino también a partir de las dendritas y cuerpos celulares de neuronas nigro-estriales, donde su liberación espontánea no es afectada por la despolarización química o eléctrica del tejido nigral. Estos datos sugieren, en un contexto general, que su presencia en el medio extracelular no parece estar sujeta a un proceso secretorio dependiente de las respuestas modulatorias asociadas a las señales específicas de actividad neural (Greenfield, 1984a). El hecho de que una alta proporción de la isoenzima se encuentre a nivel presináptico, o asociada a la membrana, sugiere que la poza liberable de la proteína no está completamente relacionada únicamente con la inactivación de ACh (Greenfield, 1984b). Diversos estudios han propuesto que la AChE liberada de las terminales axónicas de los nervios periféricos pudiese ser relevante como "material trófico" importante para mantener la integridad estructural de las neuronas (Hines y Garwood, 1977) y de las estructuras de inervación (Wallace, 1985), fenómeno que pudiera darse en las neuronas dopaminérgicas nigro-estriales (Greenfield, 1984a), como se ha demostrado su posible papel como factor neurotrófico en el desarrollo y extensión de neuritas en las neuronas dopaminérgicas extraídas del

cerebro de la rata de un día de edad posnatal (Jones y col., 1995).

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

c) Liberación neuronal de AChE: Estudios in vitro

La secreción constitutiva y regulada de AChE ha sido estudiada *in vitro* en diferentes líneas celulares tumorales, así como en explantes de tejido neuronal fetal o líneas tumorales de origen neuroendócrino (Schweitzer, 1993; Biagoni y col., 1995). A partir de los cultivos primarios de neuronas de la médula espinal del pollo y del híbrido tumoral del roedor: el neuroblastoma 108CC15 y el neuroblastoma N18TG2, se ha podido estimar que la fracción de AChE, secretada por las neuronas espinales, es predominantemente la isoforma G₄, que representa 90 % de la actividad ectocelular de AChE. Asimismo, la secreción de AChE en las líneas tumorales no parece afectarse cuando éstas se exponen a un tratamiento con drogas que alteran el citoesqueleto (citocalasina B), pero sí con las drogas que alteran el transporte intracelular de las vesículas secretorias a la superficie submembranal (v.g., nocodazol), observándose que esta droga reduce la secreción de la enzima en 50 %. Estos datos sugieren que se requiere del transporte intracelular de AChE sintetizado de *ново* previo a su secreción (Biagoni y col., 1995). Los mismos estudios reflejan que, independientemente de la expresión de la actividad ectocelular de AChE en la membranas plasmáticas de las células tumorales, la aplicación de altas concentraciones del ión K⁺ en el medio de incubación (100 mmol/L), o de agonistas colinérgicos (carbacol, 100 mmol/L), produce un incremento sustancial (≈ 200 %) en la liberación de la enzima con respecto a su basal, en la liberación dependiente de la presencia del ión Ca⁺⁺ medio de incubación (Biagoni y col., 1995). Asimismo, los extractos de tejido muscular embrional del pollo parecen incrementar en 200 % la secreción espontánea de AChE neuronal, así como la actividad intracelular de la enzima, tanto en las neuronas espinales (58 %) como en el híbrido 108CC15 (57 %), en tanto que los mismos extractos musculares reducen la secreción de la enzi-

ma en 50 %, e incrementan en sólo 10 % la actividad celular de la enzima en la línea tumoral N18TG2 (Biagoni y col., 1995).

d) Funciones no acolinérgicas de la acetilcolinesterasa

Por no existir transmisión colinérgica en la sustancia nigra, los resultados de la liberación local de AChE plantean no sólo el origen exclusivo de la enzima a partir de las células nigro-estriatales dopaminérgicas (Greenfield, 1984b), su compartimentalización intracelular y los mecanismos de liberación dendrítica similar a la DA (Mercer y col., 1979; Liesli y col., 1980), sino las posibles nuevas funciones intrínsecas de esta enzima sobre la actividad neuronal de las células dopaminérgicas (Greenfield, 1984b; 1991).

En este contexto, la aplicación exógena de las concentraciones fisiológicas de la enzima, similares a las estimadas en el espacio extracelular, no sólo inhiben la tasa de disparo de las células nigro-estriatales, efecto no observado con la aplicación exógena de butirilcolinesterasa, sino que este efecto no parece ser mediado por la hidrólisis de ACh (Greenfield y col., 1981; Weston y Greenfield, 1986). Asimismo, diversos estudios conductuales han demostrado que la lesión unilateral de las fibras dopaminérgicas nigro-estriatales con 6-hidroxi-dopamina induce un patrón de giro en la rata en dirección contralateral al sitio lesionado (Ungerstedt, 1971), fenómeno que ha sido analizado como respuesta a un desequilibrio en el contenido tisular de DA, almacenada en las terminales dopaminérgicas en ambos estriados (Pycoc, 1980). Estos efectos parecen ser mimetizados con la inyección local de AChE a la sustancia nigra, en los animales que no están lesionados. Este efecto se extiende durante tres semanas por la aplicación de una dosis única de la isoenzima (Greenfield y col., 1984b). Asimismo, se ha observado que una proteasa asociada a la AChE membranar, con actividades de tipo carboxipeptidasa y tipo tripsina, parece funcionar como una enzima denominada como *APP-secretasa*, que escinde en condiciones normales una proteína (β A4) a partir de un precursor protéico transmembranar (AAP), presente en los depósitos amiloides de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer. Estos depósitos parecen contener o asociarse con la enzima AChE (Small y col., 1991).

Adicionalmente, se observó que la incubación de AChE en presencia de cromogranina A, extraída y purificada de los gránulos cromafines del bovino, puede escindir enzimáticamente y producir diferentes fragmentos peptídicos de bajo peso molecular, derivados de la cromogranina, similar al efecto de las enzimas tipo tripsina (Small y col., 1986). Independientemente de que estas actividades no esterásicas se deban a la presencia de enzimas contaminantes asociadas durante la purificación de la isoenzima (Checler y Vincent, 1989), diversos estudios han demostrado la existencia de múltiples actividades biológicas propuestas para estas enzimas (Balasubramanian y Bhanumathy, 1993) (cuadro 1).

En resumen, la AChE parece que no sólo ejerce acciones modulatorias en las neuronas nigro-estriatales, donde la secreción dendrítica de la enzima pudiese regular distintas funciones locomotoras en el animal *in vivo* (Greenfield, 1991), sino que, además, la enzima liberable parece contener unas actividades de endopeptidasas, poseer efectos tróficos en el desarrollo, crecimiento y diferenciación de neuronas en el SNC de los mamíferos, y regular la actividad iónica mediante la apertura específica de canales iónicos (Greenfield, 1984, 1991; Appleyard, 1992; Balasubramanian y Bhanumathy, 1993; Jones y col., 1995).

2. Liberación de las enzimas deshidrogenasa láctica y dopamina β -hidroxilasa

a) Liberación de la deshidrogenasa láctica (LDH)

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

CUADRO 1
Actividades biológicas propuestas para las colinesterasas

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

(Balasubramanian y Bhanumathy, 1993).

estudios anteriores, han demostrado que la activación del sistema aferente nigro-estriatal, posterior a la aplicación nigral de la amfetamina, no induce incrementos en la liberación de LDH a perfusados tanto en esta estructura como en el estriado ipsilateral (Greenfield y Shaw, 1982). En tanto que la administración local de alto K⁺ produce un incremento en la tasa de liberación espontánea de esta enzima en la sustancia *nigra* y un decremento simultáneo de esta en el estriado ipsilateral (Greenfield y col., 1983b), la lesión unilateral de la vía nigro-estriatal con 6-OH-DA, produce un decremento significativo en la liberación espontánea de ésta en la sustancia *nigra*, y una reducción de 50 % del valor obtenido de su liberación inducida por alto K⁺ en el estriado ipsilateral (Greenfield y col., 1983b). Estos datos han permitido sugerir que la liberación de la enzima en el estriado proviene de los compartimentos subcelulares en las terminales dopaminérgicas; y el incremento de su liberación está asociada al incremento de la actividad de las neuronas nigro-estriales (Greenfield y col., 1983b). Asimismo, la relación de la co-liberación de otras enzimas, conjuntamente con la LDH, como la aminopeptidasa (fracción isoenzimática de movilidad electroforética rápida), observada en diferentes condiciones experimentales, ha sugerido que ambas enzimas son co-almacenadas en los mismos compartimentos subcelulares en las neuronas nigro-estriales. Como marcadores bioquímicos de lesión tisular deben ser utilizados con cautela, además de otros marcadores citoplasmáticos, para evaluar el daño tisular durante las perfusiones cerebrales (Greenfield y col., 1983b).

Asimismo, esta enzima, conjuntamente con la liberación de proteasas inespecíficas ha sido de utilidad para evaluar la viabilidad del tejido neuronal durante la estimulación química del tejido con altas concentraciones de K⁺ durante las sesiones de perfusiones en el animal *in vivo* (Bayón y col., 1985, 1986).

b) La dopamina beta-hidroxilasa

Inicialmente, Kirchner reportó que la DA no sólo es transportada en gránulos cromafines en las células neuroendocrinas de la médula adrenal, sino que este neurotransmisor es metabolizado y convertido, por actividades enzimáticas específicas, al neurotransmisor Norepinefrina (NE) (Kirchner, 1962). Este estudio permitió identificar posteriormente la enzima catecolaminérgica responsable de la conversión DA-NE, la dopamina- β -hidroxilasa (E.C.1.14.17.1), localizándola por ensayos bioquímicos e inmunoenzimáticos en las vesículas sinápticas (SDCV) de las neuronas noradrenérgicas y en los gránulos de neurosecreción (LDCV) de los tejidos neuroendocrinos (médula adrenal), conjuntamente con la NE, cuya estimulación eléctrica o química inducía la liberación conjunta de la enzima, cromograninas y NE (Viveros y col., 1968; Geffen y col., 1969; De Potter y col., 1970; Smith y col., 1970; Matsumoto y col., 1987) (figura 3). Los estudios posteriores demostraron que los tejidos de neurosecreción y las líneas tumorales derivadas (feocromocitoma medular, PC12), expresan dos isoformas de la enzima: una fracción soluble (sDBH), conformada por una subunidad de 70 kDa, misma que es almacenada en el interior de los gránulos cromafines

y secretada bajo los mecanismos de regulación exocítica, y otra fracción membranar (mDBH) conformada por dos subunidades protéicas transmembranales de 70 y 75 kDa, cuyo sitio activo se localiza hacia el interior vesicular. Esta es reciclada después de la exocitosis del material soluble intravesicular (Tong y Huang, 1986; Taylor y Fleming, 1989). El análisis de la secuencia de aminoácidos de la enzima, deducido mediante la identificación y clonación de diversos cDNAs, aislados del feocromocitoma de bovinos y de seres humanos, ha permitido demostrar un fragmento peptídico hidrofóbico en el extremo amino terminal de la proteína precursora responsable del anclaje membranar de la enzima a las vesículas de secreción (Taylor y Fleming, 1989), lo que permite presuponer que las dos isoformas enzimáticas son resultado de cambios postraduccionales, como la glucosilación y la escisión del fragmento hidrofóbico del extremo amino terminal, determinando el anclaje membranar de una isoforma, mediado por la unión no covalente de lípidos, como la fosfatidilserina y el pH intravesicular (Taylor y Fleming, 1989). Asimismo, diversos estudios han revelado la colocalización inmunohistoquímica de esta enzima en las neuronas y en los sistemas adrenérgicos del SN de vertebrados e invertebrados, conjuntamente con péptidos bioactivos y proteínas, como la GAP43, contenidos en diferentes tipos de vesículas exocíticas (Schwarzenbrunner y col., 1992; Bailhache y Bathazart, 1993; Berger y Alvarez, 1994; Wotherspoon y Prestley, 1995).

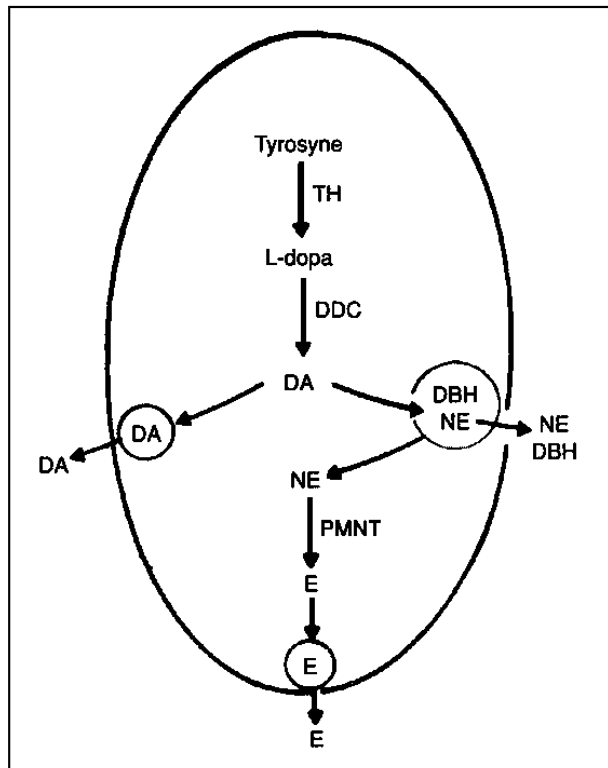


Figura 3. Síntesis, almacenamiento y liberación de catecolaminas. En las neuronas dopaminérgicas (DA), la dopamina es liberada a partir de las vesículas correspondientes. Asimismo, en las neuronas noradrenérgicas (NE), la norepinefrina es sintetizada a partir de DA, concentrada y almacenada en vesículas que contienen la dopamina-beta-hidroxilasa (DBH). Durante la exocitosis, tanto la EN como la DBH son liberadas al medio extracelular (Tong y Onyou, 1989).

3. Neurotrofinas

a). Introducción

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

b) Las neurotrofinas y sus receptores

Por medio de la biología molecular, de las técnicas de recombinación genómica y de la generación de anticuerpos específicos se han podido determinar tres grupos de genes que codifican en los vertebrados y en las especies marinas diversos grupos de proteínas tróficas secretorias (v.g., el factor de crecimiento glial GDNF) (Henderson y col., 1994) conformados en homodímeros naturales y heterodímeros artificiales (BDNF-NT-3) (Acklin y col., 1993; Jungbluth y col., 1994), como son el factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*); la neurotrofina-3 (NT-3), el factor de crecimiento neural (NGF), la neurotrofina-4 (NT-4) aislado y clonado a partir del *xenopus laevis* (Hallbook y col., 1991) y su equivalente en especies mamíferas, la neurotrofina-5 (NT-5), designados como NT-4/5 por mostrar propiedades tróficas similares en diferentes líneas celulares y sistemas de ensayo *in vitro* (Davies y col., 1993^a, Lewin y Barde, 1996) y la neurotrofina NT-6 (Gotz y col., 1994). Estas proteínas, además de ejercer propiedades neurotró-

ficas en diferentes sistemas celulares *in vitro* e *in vivo* (Lewin y Barde, 1996) muestran una alta homología en su secuencia de aminoácidos, lo que ha permitido suponer el origen ancestral de las proteínas secretorias, como el BDNF y NT-3 anterior a la aparición filogenética del NGF (Barde, 1994), probablemente a partir de un gen ancestral de la neurotrofina NT-3 (Urfer y col., 1994).

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

REFERENCIAS

1. ACKLIN C, STONEY K, ROSENFELD RA, MILLER JA, RHODE MF: Recombinant human brain-derived neurotrophic factor (rhBDNF). *Int J Peptide Prot Res*, 41:548-56, 1993.
2. ANTON ES, WESKAMP G, NARHI LO, MILLER JA, TALVENHEIMO J: Nerve growth factor and its low affinity

- receptor gene promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:2795-99, 1994.
3. APPLEYARD ME, VERCHER JL, GREENFIELD SA: Release of acetylcholinesterase from guinea pig cerebellum *in vivo*. *Neuroscience*, 25:133-138, 1988.
4. APPLEYARD ME: Secreted acetylcholinesterase: non

- classical aspects of a classical enzyme. *Trends Neurosci*, 15:485-490, 1992.
5. ATTACK JR, PERRY KP, BONHAM JR, PERRY RH: Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in human plasma and cerebrospinal fluid. *J Neurochem*, 48:1845-50, 1987.
 6. AVERILL S, MCMAHON SB, CLARY DO, REINCHARDT LF, PRESTLEY JVP: TrkA immunohistochemistry in adult dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci*, 7:148-94, 1994.
 7. BAILHACHE T, BALTHAZART J: The catecholaminergic system of the quail brain: immunohistochemical studies of dopamine beta hydroxylase and tyrosine hydroxylase. *J Comp Neurol*, 329(2):230-56, 1993.
 8. BALASUBRAMANIANAS, BHANUMATHY CD: Noncholinergic functions of cholinesterases. *FASEB J*, 7:1354-58, 1993.
 9. BARBACID M: The trk family of neurotrophins receptors. *J Neurobiol*, 25:1386-403, 1994.
 10. BARDE YA: Neurotrophic factors: an evolutionary perspective. *J Neurobiol*, 25:1329-33, 1994.
 11. BARREGI SR, GIACOBINI E: Acetylcholinesterase activity in ventricular and cisternal CSF of dogs: effects of chlorpromazine. *J Neurosci Res*, 31:335-339, 1978.
 12. BAYONA, DRUCKER-COLIN RR: Methodological alternatives and experimental strategies for studying the *in vivo* perfusion and release of neuroactive substances in the central nervous system. En: *In Vivo Perfusion and Release of Neuroactive Substances, Methods and Strategies*. Bayón A, Drucker-Colin RR, (eds.). Academic Press, 1-7, 1985.
 13. 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. *Ann NY Acad Sci*, 473:401-417, 1986.
 14. BERGER B, ALVAREZ C: Neurochemical development of hippocampal region in the fetal rhesus monkey. II. Immunocytochemistry of peptides, calcium-binding proteins, DARP32, and monoamine innervation in the entorhinal cortex by the end of gestation. *Hippocampus*, 4(1):85-114, 1994.
 15. BERNINGER B, GARCIA DE, INAGAKI N, HAHNEL C, LINDHOLM H: BDNF and NT-3 induce intracellular Ca^{2+} elevation in hippocampal neurons. *Neuroreport*, 4:1303-6, 1993.
 16. BIAGONI S, BEVILACQUA P, SCARSELLA G, VIGNOLI AL, AUGUSTI-TOCO G: Characterization of acetylcholinesterase secretion in neuronal cultures and regulation by high K^{+} and soluble factors from target cells. *J Neurochem*, 64:1528-35, 1995.
 17. BILLIARD J, KOH DS, BADCOCK DF, HILLE B: Protein Kinase C as a signal for exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(22):12192-7, 1997.
 18. BON S, BADER MF, AUNIS D, MASSOULIE J HENRY JP: Subcellular distribution of acetylcholinesterase forms in chromaffin cells: Do chromaffin granules contain a specific secretory acetylcholinesterase. *Eur J Pharmacol*, 190:221-232, 1990.
 19. BRECKNELL JE, DU JS, MUIR E, FIDLER PS, HAVLIN ML, DUNNETT SB, FAWCETT JW: Bridge grafts of fibroblast growth factor-4-secreting schwannoma cells promote functional axonal regeneration in the nigrostriatal pathway of the adult rat. *Neuroscience*, 74(3):775-84, 1996.
 20. BRIMIJOIN S: Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve, and muscle: localization and dynamics. *Prog in Neurobiol*, 21:291-322, 1983.
 21. BRIMIJOIN S, BALM M, HAMMOND P, LENNON VA: Selective complexing of acetylcholinesterase in brain by intravenously administered monoclonal antibody. *J Neurochem*, 54:236-241, 1990.
 22. BUTCHER LL, WOOLF NJ: Monoaminergic-cholinergic relationship in the chemical communication matrix of the substantia nigra and neostriatum. *Brain Res Bull*, 9:475, 1982.
 23. CABELLI RJ, HOHN A, SHATZ CJ: Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT4/5 or BDNF. *Science*, 267:1662-66, 1995.
 24. CARTER B, ZIRRGIEBEL U, BARDE YA: Differential regulation of p21-ras activation in neurons by the nerve growth factor and brain derived growth factor. *JBC*, 270:21751-57, 1995.
 25. COHEN-COREY S, FRASER SE: BDNF in the development of the visual system of *Xenopus*. *Neuron*, 12:747-61, 1994.
 26. CHECLER F, VINCENT JP: Peptidase activities associated with acetylcholinesterase are due to contaminating enzymes. *J Neurochem*, 53:924-928, 1989.
 27. CHOI RC, YUNG LY, WAN DC, DONG TT, WONG YH, TSIM KW: The calcitonin gene-related peptide-induced acetylcholinesterase synthesis in cultured chick myotubes is mediated by cyclic AMP. *J Neurochem*, 71(1):152-60, 1998.
 28. CHUBB IW, SMITH AD: Increase concentration of an isoenzyme of acetylcholinesterase in rabbit cerebrospinal fluid after peripheral stimulation. *J Physiol (Londres)*, 242:118-120, 1974.
 29. CHUBB IW, SMITH AD: Release of acetylcholinesterase into the perfusate from the ox adrenal gland. *Proc R Soc Lond*, 191:263-269, 1975.
 30. CHUBB IW, SMITH AD: Isoenzymes of soluble and membrane bound acetylcholinesterase in bovine splanchnic nerve and adrenal medulla. *Proc R Soc Lond*, 191:245-261, 1975b.
 31. CHUBB IW, GODMAN S, SMITH AD: Is acetylcholinesterase secreted from central neurons into the cerebrospinal fluid? *Neuroscience*, 1:57-62, 1976.
 32. DARVESH S, GRANTHAM DL, HOPKINS DA: Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *J Comp Neurol*, 393(3):374-90, 1998.
 33. DAVIES AM: The role of neurotrophins in the developing nervous system. *J Neurobiol*, 25:1334-48, 1994.
 34. DAVIES AM, HORTON A, BURTON LE, SCHMELZER C, VANDLEN R: Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific survival factor for distinct populations of sensory neurons. *Neuron*, 11:565-74, 1993.
 35. DAVSON H: *Physiology of the Cerebrospinal Fluid*. JA Churchill, Londres, 1970.
 36. DE POTTER WP, SMITH AD, DE SCHAEPEDRYVER AF: Subcellular fractionation of the splenic nerve: ATP, chromogranin A and dopamine-beta-hydroxylase in noradrenergic vesicles. *Tissue Cell*, 2:529-546, 1970.
 37. ENFORS P, VAN DEN WATER T, LORING T, JAENISCH R: Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron*, 14:1153-64, 1995.
 38. ENGEL AK, KRETZBERG GW: Changes of acetylcholinesterase molecular forms in regenerating motor neurons. *Neuroscience*, 18(2):467-473, 1986.
 39. FADIC R, INESTROSA NC: Nerve regulation of class I and class II asymmetric forms of acetylcholinesterase in rat skeletal muscle. *J Neurosci*, 22:449-455, 1989.
 40. FRANKLIN JL, JOHNSON EM: Control coupling in neuronal size homeostasis by trophic factor-mediated coupling of protein degradation to protein synthesis. *JBC*, 142(5):1313-24, 1998.
 41. FUENTES ME, ROSENBERG TL, INESTROSA NC: A 13kDa fragment is responsible for the hydrophobic aggregation of brain G4 acetylcholinesterase. *Biochem J*, 256:1047-50, 1988.
 42. GEFFEN L, LIVETT BG, RUSH L: Immunohistochemical localization of chromogranins in sheep sympathetic neurons and their release by nerve impulses. En: *New Aspects of Storage and Release Mechanisms of Catecholamines*. Kronenberg HG, Schuman HJ (eds.). Springer Verlag, 58-72, Nueva York, 1970.
 43. GEULA C, MESULAM MM, TOKUNO H, CHIN KUO C: Developmentally transient expression of acetylcholinesterase within cortical pyramidal neurons of the rat brain. *Develop Brain Res*, 76:23-31, 1973.
 44. GÖTZ R, KÖSTER R, WINKLER C, RAULF F, LOTTSPEICH F: Neurotrophin-6 is a new member of nerve growth factor family. *Nature*, 372:266-69, 1994.
 45. GRATZL M, KEIEGER-BRAUER H, EKERDT R: Latent acetylcholinesterase in secretory vesicles isolated from adrenal medulla. *Biochimica et Biophysica Acta*, 549:355-366, 1981.

46. GREENFIELD SA: A noncholinergic function of acetylcholinesterase in the brain: From neuronal secretion to generation of movement. *Cel And Mol Neurobiol*, 11(1):55-77, 1991.
47. GREENFIELD SA: Enzymes as nigrostriatal modulators. En: *The Basal Ganglia. Adv Behav Biol*. McKenzie JS, Kemm RE, Wilcock LM (eds.). Plenum Press, Nueva York, 27:319-322, 1984a.
48. GREENFIELD SA, SHAW SG: Release of acetylcholinesterase and aminopeptidase in vivo following infusion of amphetamine into the substantia nigra. *Neuroscience*, 7: 2883-93, 1982.
49. GREENFIELD SA, SMITH AD: The influence of electrical stimulation of certain brain regions on the concentration of acetylcholinesterase in rabbit cerebrospinal fluid. *Brain Res*, 177:445-459, 1979.
50. GREENFIELD SA, CHERAMY A, GLOWINSKI J: Evoked release of proteins from central neurons in vivo. *J Neurochem*, 40:1048-57, 1983a.
51. GREENFIELD SA, CHERAMY A, LEVIEL V, GLOWINSKI J: In vivo release of acetylcholinesterase in the cat substantia nigra and caudate nuclei. *Nature*, 284: 355, 1980.
52. GREENFIELD SA, CHUBB IW, SMITH AD: The effect of chlorpromazine on the concentration of acetylcholinesterase in the cerebrospinal fluid of rabbits. *Neuropharmacol*, 18:127-132, 1978.
53. GREENFIELD SA, CHUBB IW, GRUNEWALD RA, HENDERSON Z, MAY J, PORTNEY S, WESTON J, WRIGHT HC: A non-cholinergic function for acetylcholinesterase in the substantia nigra: Behavioural evidence. *Exp Brain Res*, 54:513-520, 1984b.
54. GREENFIELD SA, CHUBB IW, GRUNEWALD RA, HENDERSON Z, MAY J, PORTNEY S, WESTON J, WRIGHT HC: A noncholinergic function of acetylcholinesterase in the substantia nigra: behavioral evidence. *Exp Br Res*, 54(39):83-88, 1984.
55. GREENFIELD SA, GRUNWALD RA, FOLEY P, SHAW SG: Origin of various enzymes released from the substantia nigra and caudate nucleus: effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nigro-striatal pathway. *J Comp Neurol*, 214:87, 1983b.
56. GREENFIELD SA, STEIN JF, HODGSON AJ, CHUBB IW: Depression of nigral pars compacta cell discharge by exogenous acetylcholinesterase. *Neuroscience*, 6:2287-95, 1981.
57. HAGG T, VARON S: CNTF prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(13):6315-19, 1993.
58. HENDERSON CE, PHILLIPS HS, POLLOCK RA, DAVIES AM, LEMELEU C: GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, 266:1062-64, 1994.
59. HINES JF, GARWOOD MM: Release of protein from axon during rapid axonal transport: An in vitro preparation. *Brain Res*, 125:141-148, 1977.
60. HOFER M, BARDE YA: Brain derived neurotrophic factors prevents neuronal death in vivo. *Nature*, 331:261-62, 1988.
61. HORY-LEE F, RUSSELL M, LINDSAY RM, FRANK M: Neurotrophin 3 supports the survival of developing muscle sensory neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:2613-17, 1993.
62. INESTROSA NC, PERELMAN A: Distribution and anchoring of molecular forms of acetylcholinesterase. *Trends Pharmacol*, 10:325-329, 1989.
63. JONES SA, HOLMES C, BUDD TC, GREENFIELD SA: The effect of acetylcholinesterase on outgrowth of dopaminergic neurons in organotypic slice culture of rat midbrain. *Cel Tissue Res*, 279:323-330, 1995.
64. JUNGBLUTH S, BAILEY K, BARDE YA: Purification and characterization of a brain derived neurotrophic factor/neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer. *Eur J Biochem*, 221:571-84, 1994.
65. KARPEL R, BEN AZIZ-AYOLA R, STERNFIELD M, EHRlich G, GINZBERG D, TARRONI P, CLEMENTI F, ZAKUT H, SOREQ H: Expression of three alternative acetylcholinesterase messengers RNAs in human tumor cell lines of different tissue origins. *Exp Cell Res*, 210:268-277, 1994.
66. KASA P: Acetylcholinesterase transport in the central and peripheral nervous tissue: the role of tubules in the enzyme transport. *Nature*, 218:1265-67, 1968.
67. KIRSCHNER N: *JBC*, 237:2311-17, 1962.
68. KOELLE GB: Enhancement of acetylcholinesterase synthesis by glycyl-L-glutamine: an example of a small peptide that regulates differential transcription? *Trends Pharmacol*, 9:318-321, 1988.
69. KORTE M, CARROLL P, WOLF E, BRENN G, THOENEN H: Hippocampal long term potentiation is impaired in mice lacking BDNF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 192:8856-60, 1995.
70. KOSHKULOVA S, FINN TP, NISHI R, HALVORSEN SW: Identification of functional receptors for ciliary neurotrophic factor on ciliary ganglion neurons. *Neuroscience*, 72(3):821-32, 1996.
71. KREUTZBERG GW, KAIYA H: Exogenous acetylcholinesterase as a tracer for extracellular pathways in the brain. *Histochemie*, 42:233-237, 1974.
72. KREUTZBERG GW, TOTH L: Dendritic secretion: a way for neuron to communicate with the vasculature. *Naturwissenschaften*, 61:37, 1974.
73. LANDWEHRMEYER B, PROBST A, PALACIOS JM, MENGOD G: Expression of acetylcholinesterase messenger RNA in human brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience*, 57(3):615-634, 1993.
74. LAYER PG, ALBER R, SPORNS O: Quantitative development and molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase during morphogenesis and synaptogenesis of the chick brain and retina. *J Neurochem*, 49:175-182, 1987.
75. LEHMAN J, FIBIGIER HC: Acetylcholinesterase in the substantia nigra and caudate-putamen: properties and localization in dopamine neurons. *J Neurochem*, 30:615, 1978.
76. LEVI-MONTALCINI R, BROOKER B: Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by antiserum to a nerve growth factor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 46:384-91, 1960.
77. LEVIEL V, CHERAMY A, GLOWINSKI J: Role of dendritic release of dopamine in the reciprocal control of the two nigro-striatal dopaminergic pathways. *Nature*, 280:236, 1979.
78. LEWIN GR, BARDE YA: Physiology of neurotrophins. *Ann Rev Neurosci*, 19:289-317, 1996.
79. LEWIS HS, PRESCOTT DJ: Aggregation properties of the acetylcholinesterase from the central nervous system of *Manduca sexta*. *J Neurochem*, 38:1709-18, 1982.
80. LI Y, CAMP S, RACHINSKY TL, MUFSON EJ, MESULAM MM: Gene structure of mammalian acetylcholinesterase: Alternative exons dictate tissue specific expression. *JBC*, 266(23):83-90, 1991.
81. LIU JC, YANG RS, FU WM: Regulation of quantal secretion by neurotrophic factors at developing motoneurons in *Xenopus* cell cultures. *J Physiol (Lond)*, 503 (Pt-1):129-139, 1998.
82. MARTY S, CARROLL P, CELLERINO A, CASTREN E, STAIGER V, THOENEN H, LINDHOLM D: BDNF promotes the differentiation of various hippocampal nonpyramidal neurons, including Cajal-Retzius cells in organotypic slice cultures. *J Neurosci*, 16(2):675-87, 1996.
83. MATSUMOTO S, TANAKA K, YAMAMOTO A, NAKADA H, UCHIDA MM, TASHIRO Y: Immunoelectron microscopic localization of DBH and chromogranin A in adrenergic chromaffin cells. *Cell Struct Funct*, 12(5):483-96, 1987.
84. MERCER L, DEL FIACCO M, CUELLO AC: The smooth endoplasmic reticulum as a possible storage site for dendritic dopamine in substantia nigra neurons. *Experientia*, 35:101-103, 1979.
85. MESULAM MM, GEULA C: Chemoarchitecture of axonal and perikaryal acetylcholinesterase along information processing systems of the human cerebral cortex. *Brain Res Bull*, 33:137-153, 1994.

86. MEYER W, SCHARDINEL J, SCHLESINGER C: Distribution of acetylcholinesterase in the central nervous system of harvesten. *Neurosci Lett*, 256(2):97-100.
87. MILLAR TJ, CHUBB IW: The ultrastructural localization of acetylcholinesterase-like immunoreactivity in the chicken retina. *Brain Res*, 421:297-308, 1987.
88. MIZOBE F, MACHIKO I, LIVETT BG: Parallel but separate release of catecholamines and acetylcholinesterase from stimulated adrenal chromaffin cells in culture. *J Neurochem*, 42:1433-38, 1984.
89. MONNERIE H, DASTUGUE B, MEINEL A: In vitro differentiation of chick spinal cord neurons in the presence of Reissner's fibre, an ependymal secretion. *Brain Res Dev Brain Res*, 192(2):167-176, 1997.
90. PETERSON GM, GINN SR, LANFORD GW: Fibers immunoreactive for nerve growth factor receptor in adult rat cortex and hippocampus mimic the innervation pattern of AChE positive fibers. *Brain Res Bull*, 33:129-136, 1994.
91. PLANAS AM, CROUZEL C, HINNEN F, JOBERT A: Rat brain acetylcholinesterase visualized with. En: DiGiamberardino L, Tavittian B. !IC-physostigmine. *Neuroimage*, 1(3):173-80, 1994.
92. PLATTNER F, HINTER A: Die Spaltung von acetylcholin durch organextrakte und Korpreflussigkeiten. *Pflügers. Arch Ger Physiol*, 225:19-25, 1930.
93. POGORELOVAG, BUDANTSEVAY, POGORELOVAVN: Quantitative electron probe microanalysis of acetylcholinesterase activity in rat brain sections. *J Histochem Cytochem*, 41(12):1795-1800, 1993.
94. POKAY M, GRANT P: Choline acetyltransferase and cholinesterases in the developing Xenopus retina. *J Neurochem*, 42:1328-37, 1984.
95. PYCKOCK C: Turning behavior in animals. *Neuroscience*, 5:461, 1980.
96. RAITERI M, MARCHI M, CAVIGLIA AM: Studies of a possible functional coupling between presynaptic acetylcholinesterase and high-affinity choline uptake in the rat brain. *J Neurochem*, 47:1696-99, 1986.
97. RANDALL WR: Cellular expression of a cloned, hydrophilic, murine acetylcholinesterase. *JBC*, 269(16): 12367-74, 1994.
98. ROSSI SG, ROTUNDO RL: Cell surface acetylcholinesterase molecules on multinucleated myotubes are clustered over the nucleus origin. *JBC*, 119(6):1657-67, 1992.
99. ROTUNDO LR, FAMBROUGH DM: Synthesis, transport and fate of Acetylcholinesterase in cultured chick embryo muscle cells. *Cell*, 22:583-594, 1980.
100. ROTUNDO LR: Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:479-483, 1984.
101. ROTUNDO RL, CARBONETTO ST: Neurons segregate clusters of membrane-bound acetylcholinesterase along their neurites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:2063-67, 1987.
102. RYDEN M, MURRAY-RUST J, GLASS D, ILAG M, TRUPP M: Functional analysis of mutant neurotrophins deficient in low-affinity binding reveals a role for p75-LNGFR in NT-4. Signalling. *EMBO J*, 14:1979-90, 1995.
103. SAEZ-VALERO J, TORNEL PL, MUÑOZ-DELGADO E, VIDAL CJ: Amphiphilic and hydrophilic forms of Acetylcholinesterase in human brain. *J Neurosci Res*, 35:678-689, 1993.
104. SCHLAGGAR BL, DE CARLOS JA, O'LEARY D: Acetylcholinesterase as an early marker of the differentiation of dorsal thalamus in embryonic rats. *Develop Brain Res*, 75:19-30, 1993.
105. SCHWARZENBRUNNER U, SCHMIDEL T, OBENDORF D, SCHERMAN D, HOOK V, FISCHER-COLBRIE R, WINKLER H: Sympathetic axons and nerve terminals: the protein composition of small and large dense-core and a third type of vesicles. *Neuroscience*, 37(3):819-27, 1990.
106. SCHWEITZER ES: Regulated and constitutive secretion of distinct molecular forms of acetylcholinesterase from PC12 cells. *J Cell Sci*, 106:731-740, 1993.
107. SCHWEITZER ES, KELLY RB: Selective packaging of human growth hormone into synaptic vesicles in a rat neuronal PC12-cell line. *JBC*, 101:667-676, 1985.
108. SILVER A: *The Biology of Cholinesterases*. Elsevier, Amsterdam, 1974.
109. SKAU KA, BRIMJOIN S: Release of acetylcholinesterase from rat hemidiaphragm preparations stimulated through the phrenic nerve. *Nature*, 275:224-226, 1978.
110. SMALL DH, ISMAEL Z, CHUBB IW: Acetylcholinesterase hydrolyses chromogranin A to yield low molecular weight peptides. *Neuroscience*, 19:289-295, 1986.
111. SMITH AD, DE POTTER WP, MOERMAN EJ, DE SCHAEPEDRYVER AF: Release of dopamine-B-hydroxylase and chromogranin A upon stimulation of the splenic nerve. *Tissue and Cell*, 2:547-568, 1970.
112. SPINEDI A, LULY P, FARIAS RN: Does the fluidity of lipid environment modulate membrane-bound acetylcholinesterase? *Biochem Pharmacol*, 46(9):1521-27, 1993.
113. TAYLOR CS, FLEMING PJ: Conversion of soluble Dopamine-Beta-Hydroxylase to a membrane binding form. *JBC*, 264(26):15242-246, 1989.
114. TONG JH, HWANG O: Dopamine Beta-Hydroxylase: Biochemistry and molecular biology. *Ann NY Acad Sci*, 342-386, 1989.
115. TOUTANT JP: Insect acetylcholinesterase catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog Neurobiol*, 32:423-446, 1989.
116. TOUTANT JP, RICHARDS MK, KRALL JA, ROSENBERY TL: Molecular forms of acetylcholinesterase in two sublines of human erythroleukemia K562 cells. *Eur J Biochem*, 187:31-38, 1990.
117. UNGERSTEDT U: Post-synaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol Scand (supl.)*, 367:69, 1971.
118. URFER R, TSOUFAS P, SOPPET D, ESCANDON E, PARADA LF: The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptor trkC and gp75 and the design of a multifunctional human neurotrophin. *EMBO J*, 13:5896-5909, 1994.
119. VIVEROS OH, ARQUEROS L, KIRSHNER N: Release of catecholamines and Dopamine- β -Hydroxylase from the adrenal medulla. *Life Sci*, 7:609-618, 1968.
120. WALLACE BG, NITKIN RM, REIST NF, JUSTIN RF, MOAYERI N, MCMAHAN UN: Aggregates of Acetylcholinesterase induced by acetylcholine receptor-aggregating factor. *Nature*, 315(6020):574-577, 1985.
121. WESTON J, GREENFIELD SA: Release of acetylcholinesterase in the rat nigrostriatal pathway: relation to receptor activation and firing rate. *Neuroscience*, 17:1079-88, 1986.
122. WILLIAMS R, BACKSTRÖM A, KULLANDER K: Developmentally regulated expression of mRNA for neurotrophin high affinity (trk) receptors within chick trigeminal sensory neurons. *Eur J Neurosci*, 7:116-28, 1995.
123. WOTHERSPOON G, PRIESTLEY JV: Co-expression of GAP-43 with dopamine-beta-hydroxylase in adult rat spinal cord. *Neuroreport*, 6(8):1113-17, 1995.
124. WRIGHT EM, SNIDER WD: Neurotrophin receptor mRNA expression defines distinct populations of neurons in rat dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*, 351:329-38, 1995.
125. YAKSH TL, FELELE LA, YAMAMURA HI: Recovery of cholinesterase activity in the cerebrospinal fluid, brainstem, and plasma of unanesthetized cat after irreversible cholinesterase inhibition. *Experimentia*, 30:38-39, 1974.
126. YAO W, GODFREY DA: Immunohistochemical evaluation of cholinergic neurons in the rat superior olivary complex. *Microsc Res Tech*, 41(3):270-83, 1998.