

C
2512
Vol. 2

4. RESULTADOS

R9.F. e

11.000

UNIVERSIDAD
AUTONOMA DE
MADRID
BIBLIOTECA
CIENCIAS

En este trabajo se analiza la aparición de las distintas formas moleculares de la acetilcolinesterasa (AChE) durante el desarrollo visual retinotectal del pollo, "in vivo" e "in vitro", con objeto de aportar datos nuevos sobre la relación que existe entre la aparición de los enzimas implicados en la neurotransmisión colinérgica y la maduración del tejido nervioso.

4.1 SITUACION DEL SISTEMA VISUAL RETINOTECTAL DEL POLLO DURANTE EL DESARROLLO.

4.1.1. Desarrollo "in vivo".

Durante el desarrollo cambian las dimensiones y la estructura de los tejidos y órganos a través de un proceso ordenado de crecimiento. Para caracterizar globalmente este proceso es útil determinar los perfiles de variación de la cantidad de proteína y DNA en la retina y el tectum óptico de embriones y pollos jóvenes entre el 8º día de desarrollo embrionario y el día 10º del desarrollo postnatal. Los resultados se resumen en la Fig. 11. Los valores que se muestran en el panel superior son los obtenidos en el caso de la retina; en el panel inferior se representa la cantidad de proteína y DNA en el tectum.

Estos datos se expresan por animal, es decir por par de retinas o lóbulos tectales en los distintos tiempos de

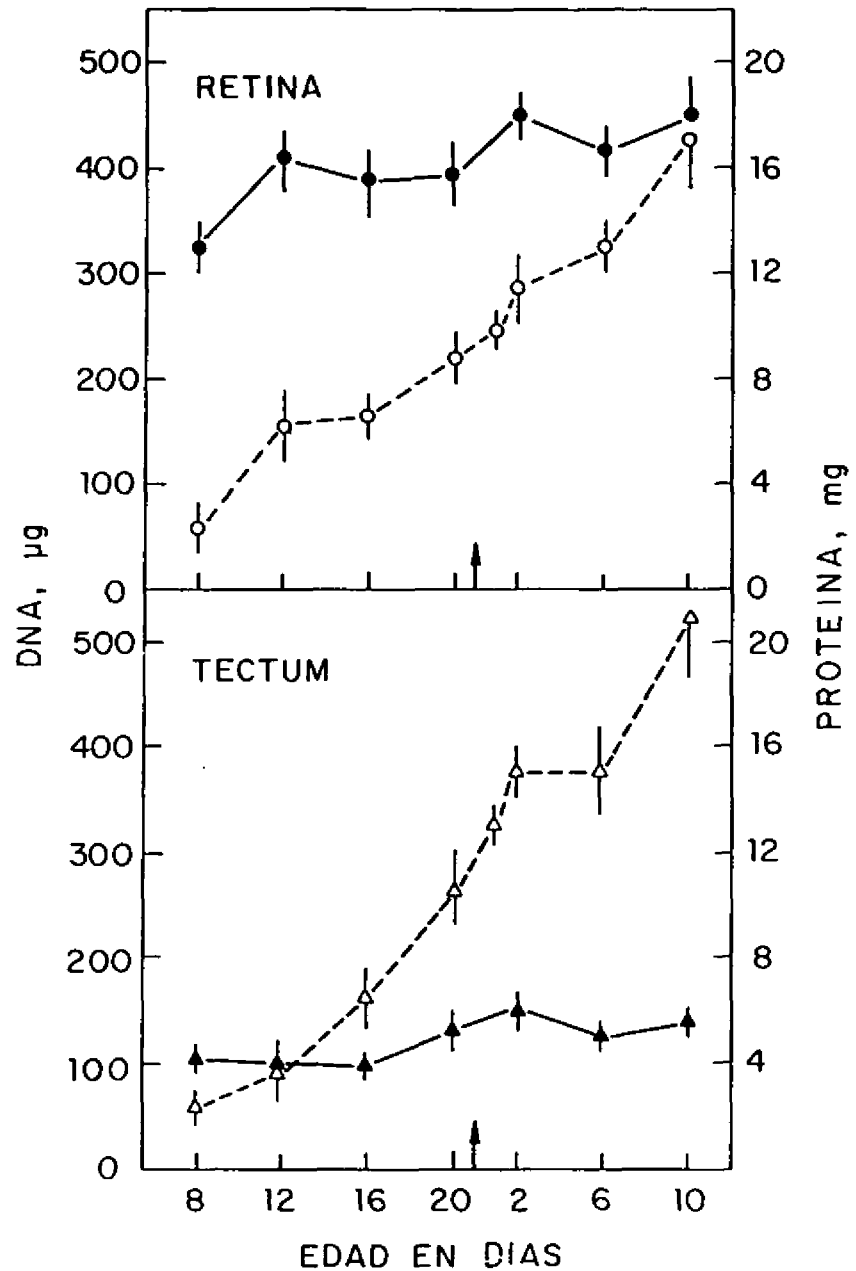


Figura 11.- Cambios en el contenido en DNA y proteínas de la retina (panel superior) y el tectum óptico del pollo (panel inferior), entre los días 89 del desarrollo embrionario y 109 del desarrollo postnatal.

Los valores que se dan en la ordenada de la izquierda, representan el contenido en DNA, en µg (● = DNA-retina, ▲ = DNA-tectum). En la ordenada de la derecha se dan los valores de cantidad de proteína en mg (○ = proteína retina, △ = proteína tectum). En ambos casos los valores que se expresan son los obtenidos por animal. En abscisas se representa la edad del animal en días. La flecha en las abscisas indica el momento de la eclosión del huevo. Las líneas verticales en cada punto, representan la desviación estándar (D.E.) de 3 determinaciones independientes en las que se utilizaron 12 embriones o pollos.

4.1.1.1. Actividad de los enzimas colinérgicos durante el desarrollo "in vivo".

Una vez caracterizado el estado de desarrollo de los tejidos sometidos a estudio, pasamos a analizar perfiles globales de desarrollo de AChE y de colina acetiltransferasa (ChAT, que utilizamos como marcador de sinapsis colinérgicas).

En la Fig. 12 se muestran los perfiles de desarrollo de la AChE medida en homogenados de retina y tectum, tanto en términos de actividad específica, referidos a mg de proteína, como en actividad total por par de retinas (panel superior), o por de lóbulos tectales (panel inferior). En esta figura se ha añadido el punto de 180 días de desarrollo (6 meses) como medida de los niveles de enzima en el pollo adulto, en los que se supone que se ha llegado al "estado estacionario" en cuanto a actividad.

En los perfiles de desarrollo se incluyen dos puntos muy próximos, los de los días 1 y 2 de desarrollo postnatal porque es el momento en el que se producen las variaciones más destacables debidas a que el pollo abre los ojos y recibe por primera vez el estímulo luminoso.

Los resultados que se muestran en la Fig. 12 indican que en la retina y el tectum antes del nacimiento tiene lugar el mayor aumento de actividad específica de la AChE. El aumento en actividad total del enzima continúa tras el nacimiento al menos, en los puntos considerados en este estudio.

La Fig. 13 muestra los perfiles de desarrollo de la ChAT entre los días 8º del desarrollo embrionario y 20 del desarrollo postnatal. El objeto de estudiar la variación de actividad de este enzima es tener un buen marcador de sinapsis colinérgicas, con el que comparar los resultados obtenidos en la actividad AChE, durante el desarrollo en la retina y tectum.

Los resultados muestran un aumento constante de la actividad con pequeñas variaciones, sobre todo en la retina en los primeros días de apertura de los ojos.

Figura 12. - Perfiles de desarrollo de la actividad AChE en la retina y el tectum. La actividad específica se representa en la ordenada de la izquierda y las unidades de actividad total se dan en la ordenada de la derecha. Los puntos y las barras indican el valor medio \pm D.E. de 4 determinaciones diferentes = actividad específica de la retina, o = actividad total en la retina, = actividad específica en el tectum y = actividad total en el tectum. Otros datos se citan en la Fig. 11.

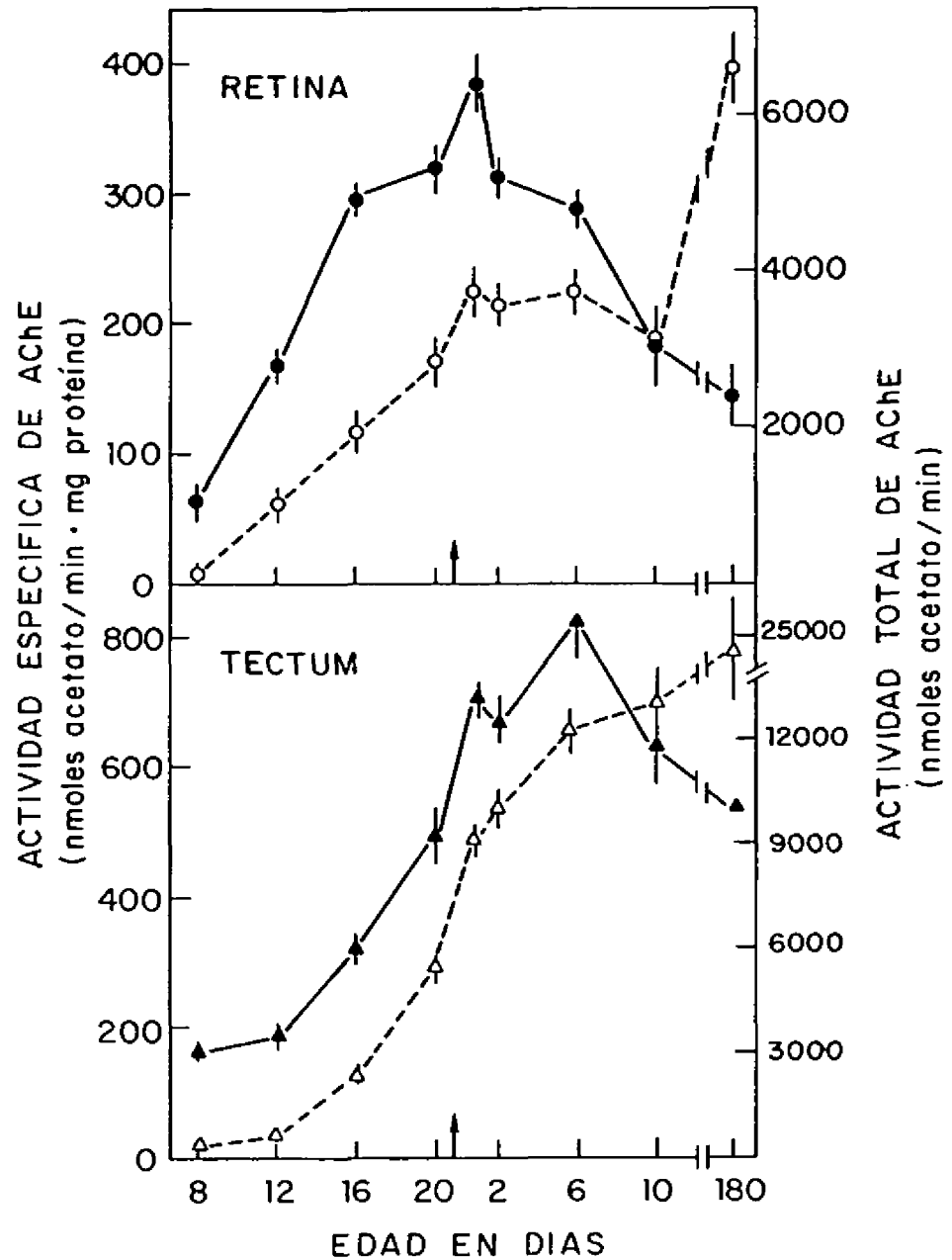


Figura 12.- Perfiles de desarrollo de la actividad AChE en la retina y el tectum. La actividad específica se representa en la ordenada de la izquierda y las unidades de actividad total se dan en la ordenada de la derecha. Los puntos y las barras indican el valor medio \pm D.E. de 4 determinaciones diferentes. \bullet = actividad específica de la retina, \circ = actividad total en la retina, \blacktriangle = actividad específica en el tectum y \triangle = actividad total en el tectum. Otros datos se citan en la Fig. 11.

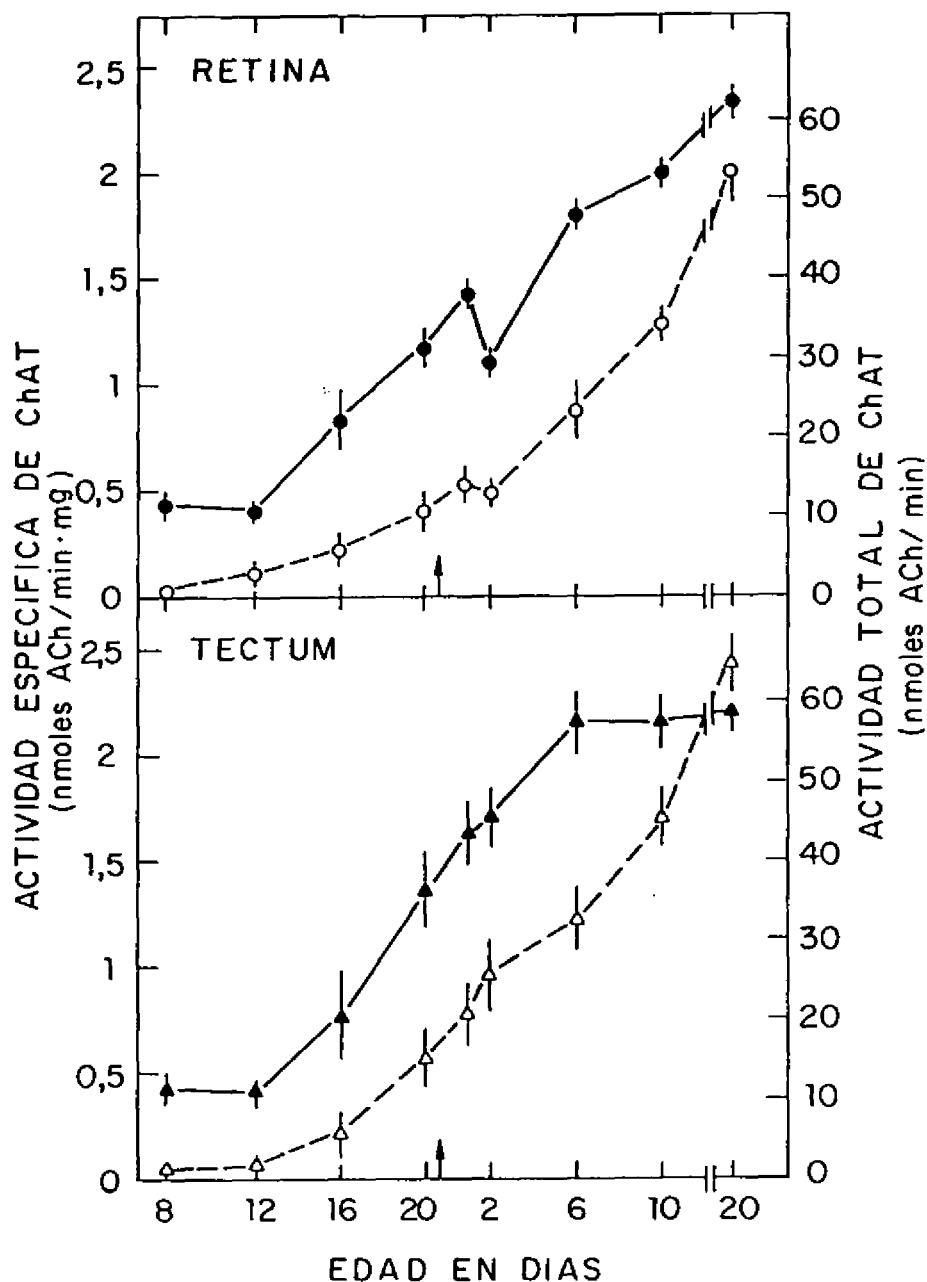


Figura 19.- Actividad de ChAT durante el desarrollo de la retina y el tectum de pollo desde el día 8^o embrionario al día 20^o postnatal. Las unidades de actividad específica se indican en la ordenada de la izquierda (● = retina, ▲ = tectum). La actividad total de ChAT se representa en la ordenada de la derecha (○ = retina, △ = tectum). Los puntos indican la media de 3 experimentos independientes.

4.1.2. Desarrollo en cultivo.

Paralelamente al estudio del desarrollo "in vivo", se realizaron estudios en cultivos de agregados celulares histotípicos preparados por disociación del tejido nervioso en células individuales y reasociación de las mismas en cultivo de suspensión en medio líquido, tal y como se indica en Métodos.

En esta sección se dan los resultados obtenidos en cultivos constituidos exclusivamente por células de retina o células de tectum, con objeto de ver la capacidad individual de desarrollo de cada una de estas estructuras que componen el sistema visual. Este tipo de cultivos ha sido empleado con éxito, para estudiar fenómenos de regulación epigenética en el desarrollo del sistema nervioso. Este sistema posee la capacidad de imitar más fielmente que otros, los procesos fisiológicos que se observan en un sistema desarrollándose "in vivo".

Para ello se disocian células de una u otra estructura de embriones de 7 a 10 días de edad de desarrollo, con las que se preparan los agregados. A partir del día 7 comienza a ser posible medir la actividad de los enzimas colinérgicos y, por otra parte, en el día 10 aún no se ha verificado la conexión mayoritaria retina-tectum.

En la Fig. 14 se muestran los perfiles de la evolución de la cantidad de DNA y proteína durante casi un mes de

desarrollo en cultivo de tejidos extraídos de embriones de 7 días. Los resultados se expresan como porcentajes con respecto al valor después de 24 horas en cultivo, que es el tiempo en el que se consolidan los agregados y son transferidos a un Erlenmeyer con medio nuevo. Se toman valores cada 7 días hasta el día 29.

En general, se observa una disminución de los porcentajes en función del tiempo, especialmente en los valores de DNA, debido probablemente a muerte celular. El crecimiento cesa más tarde como se observa en la cantidad de proteína. Este hecho es más patente en el caso de los agregados de tectum, como cabría esperar por la falta de aferencias retinianas en este cultivo (panel inferior). La relación proteína/DNA que se muestra en la Tabla II está en consonancia con este hecho.

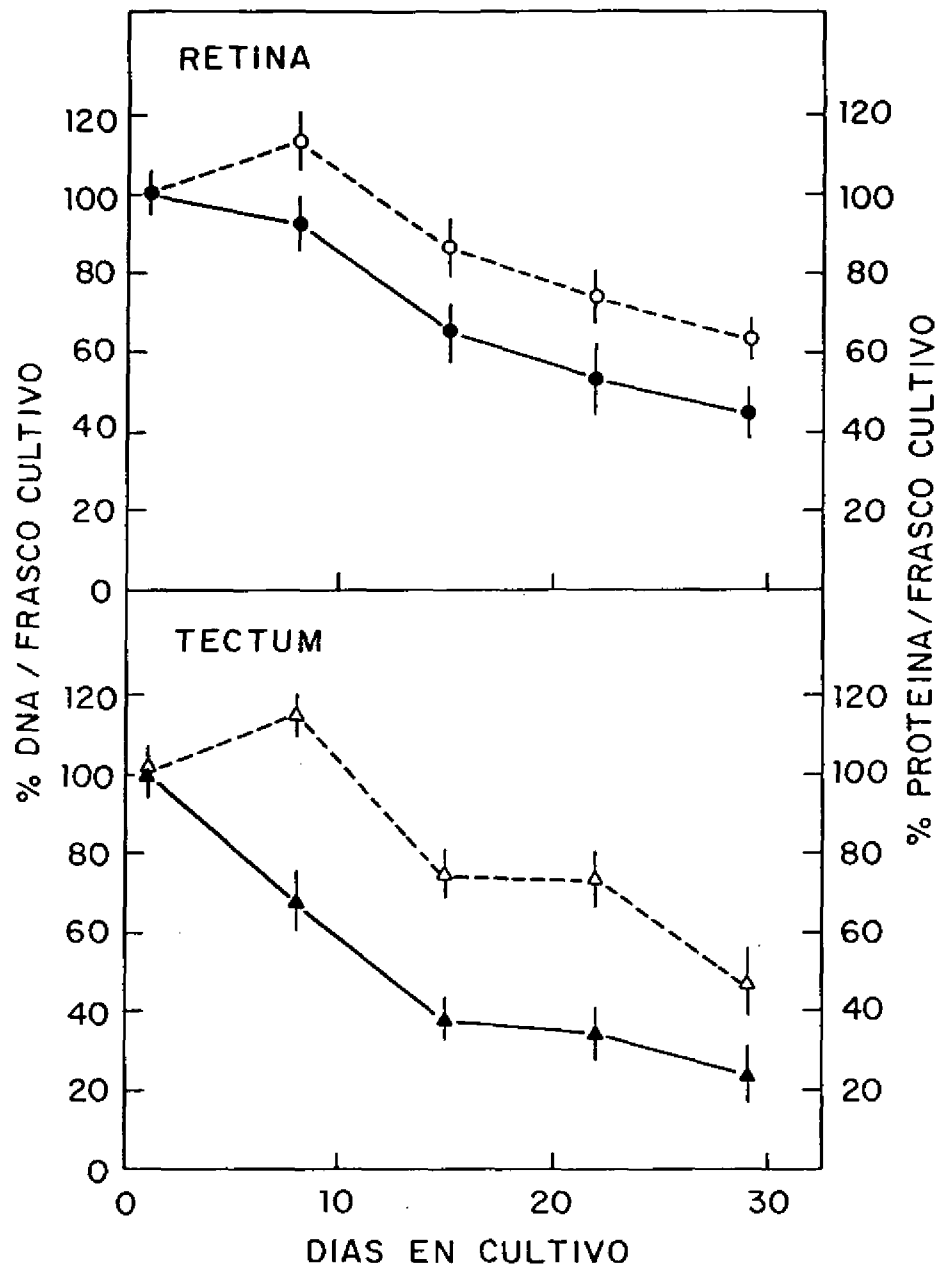


Figura 14.- Cambios en la cantidad de DNA y proteínas en la retina (panel superior) y en el tectum (panel inferior) en función del tiempo en cultivo. En la ordenada de la izquierda se indican los porcentajes de DNA por frasco de cultivo (● = retina, ▲ = tectum) y en la ordenada de la derecha se representa el porcentaje de proteína por frasco (○ = retina, △ = tectum). Los resultados se expresan como \bar{x} de los valores medidos después de 24 horas de preparación de los agregados. Se da el valor medio \pm la desviación estándar de 5 frascos de cultivo independientes. Los cultivos se prepararon con retinas o tectas de embriones de 7 días.

TABLA 11

RELACION ENTRE LA CANTIDAD DE PROTEINA Y DNA EN CULTIVOS DE AGREGADOS

RETINA

DIAS EN CULTIVO	%PROTEINA/FRASCO	%DNA/FRASCO	%PROTEINA/%DNA
1	100	100	1,0
8	113	92	1,2
15	87	65	1,3
22	75	53	1,4
29	63	45	1,4

TECTUM

DIAS EN CULTIVO	%PROTEINA/FRASCO	%DNA/FRASCO	%PROTEINA/%DNA
1	100	100	1,0
8	115	69	1,7
15	75	38	2,0
22	73	35	2,1
29	47	24	1,9

Cociente entre la cantidad de proteína en agregados de retina y tectum en cultivo. Los resultados que se muestran son los porcentajes de proteína y DNA que se muestran en la Fig. 14.

4.1.2.1. Desarrollo estructural de los agregados.

En las Figs. 15 y 16 se muestran algunos aspectos morfológicos de la diferenciación de los agregados de retina y tectum tras 24 días en cultivo. Aunque no se trata de un estudio detallado de la estructura fina de los agregados, es interesante destacar que tiene lugar una intensa diferenciación estructural en paralelo con los cambios bioquímicos que se han mostrado.

En los agregados de retina, Fig. 15, encontramos una estructura más elaborada y reproducible. La Fig. 15a presenta la principal unidad estructural, que se encuentra repetida en las secciones de agregados de retina de 24 días en cultivo. Se observa una capa nuclear densamente empaquetada rodeando una luz (lumen) y que se rodea a su vez de una red de fibras con unas pocas neuronas, de gran tamaño, dispersas. Esta estructura con forma de roseta recuerda a la de la retina "in vivo".

En la Fig. 15b se observa en detalle la capa nuclear compacta, con fotorreceptores (ph) con sus núcleos típicos y sus característicos acúmulos de mitocondrias que pueden verse cerca de la luz de la roseta. En zonas más distales, por el contrario, la población nuclear aparece más heterogénea (Fig. 15c).

En los agregados de células del tectum (Fig. 16a) se observa degeneración masiva y necrosis en el centro del agregado. Esto no debe necesariamente atribuirse a la

distancia existente entre la capa interna de células y los nutrientes en el medio de cultivo, ya que esta degeneración no se dá en los agregados de células de retina de la misma edad y tamaño, ni en preparaciones realizadas anteriormente con el cerebro de pollo completo. En contraste, la zona cortical del agregado muestra un aspecto "sano" al microscópio óptico (Fig. 16b, detalle del agregado mostrado en a).

Las observaciones al microscopio electrónico de estos agregados confirman que la estructura de las capas laterales del agregado se conserva en buen estado, presentando una diferenciación avanzada, lo cual incluye sinapsis maduras (Fig. 16c). Al avanzar hacia el núcleo interno del agregado se observan sólo algunas células de glia, que han incorporado restos de membranas, sobre un fondo acelular necrótico (Fig. 16d).

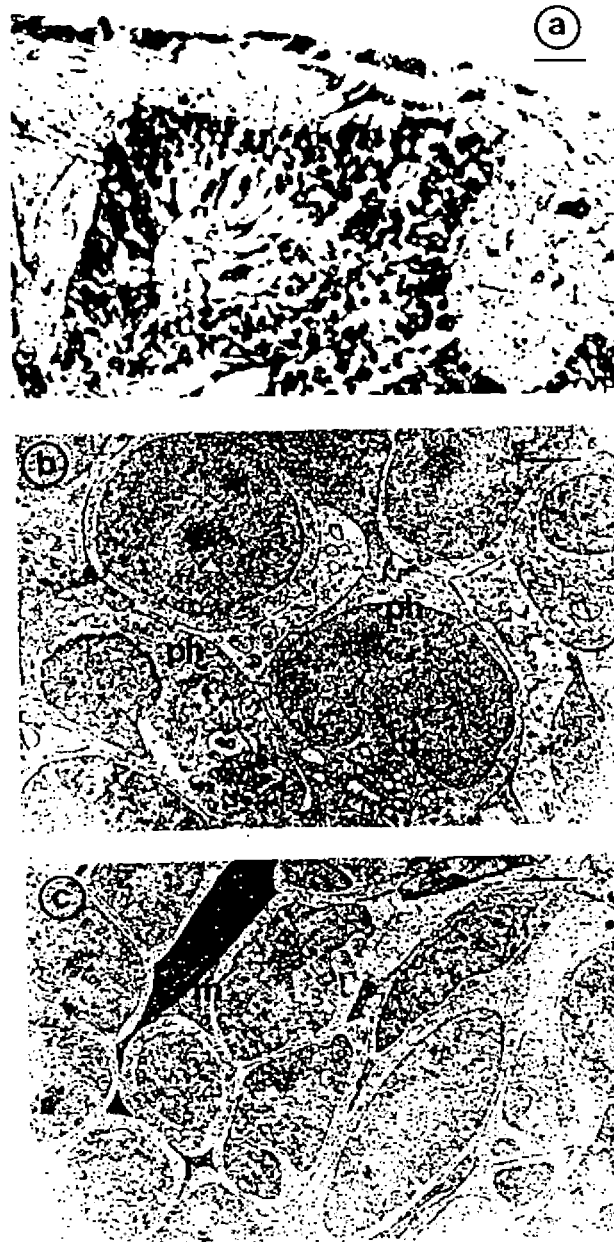


Figura 15.- Análisis estructural por microscopía óptica y electrónica de agregados de células de la retina de embriones de 24 días.

a) La zona clara de esta estructura en forma de roseta es equivalente a la capa pigmentaria "externa" de la retina madura de un pollo. La barra representa 10 μ m.

b) Capa nuclear: algunos de los núcleos se encuentran cerca de la luz; se observan dos células fotorreceptoras (ϕ) con las formaciones de mitocondrias características; escala indicada por la barra = 1.1 μ m.

c) Capa nuclear: se observa una población heterogénea de núcleos en la zona externa de la capa nuclear (con respecto a la luz). Hay células de Müller (m) con el núcleo fuertemente teñido y prolongaciones citoplásmicas oscuras. Escala de 1.4 μ m.

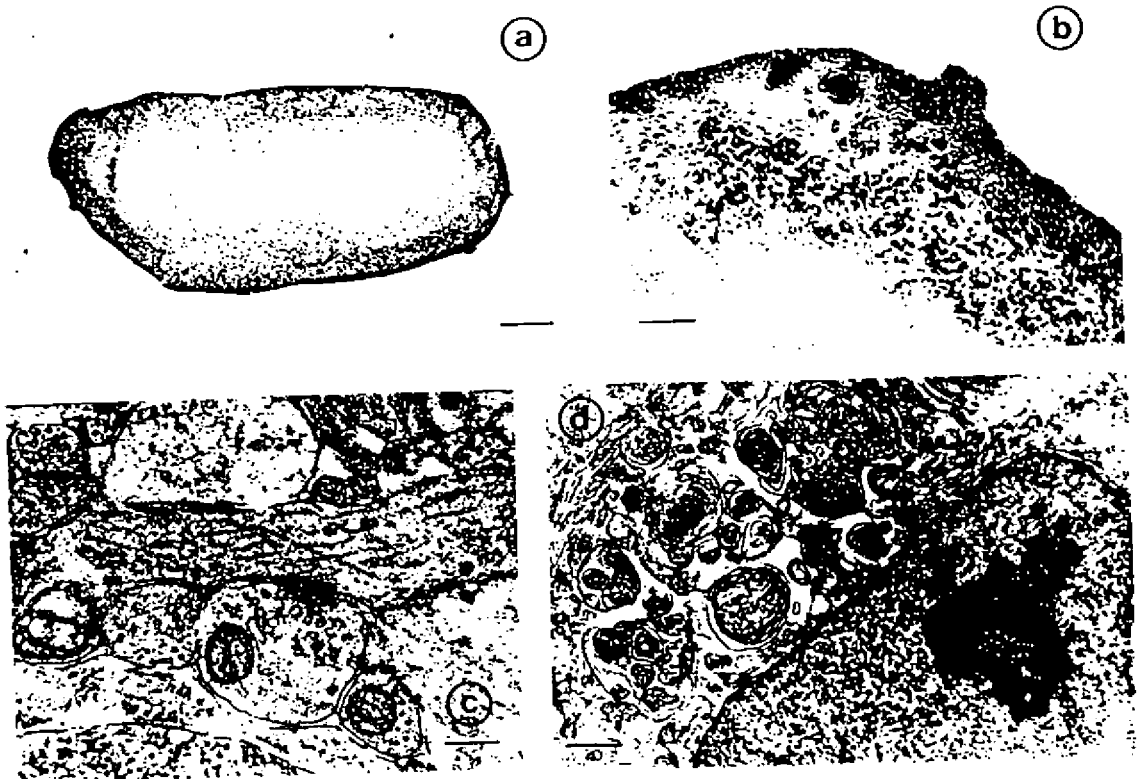


Figura 16.- Análisis estructural al microscopio óptico y electrónico de agregados constituidos por células de tectum de embriones de 24 días.

a) Aspecto general del agregado, mostrando un área cortical en buen estado y un núcleo central con signos de degeneración celular y muerte. La barra indica 200 μ m.

b) Detalle del agregado en el que se observa con más claridad la zona de los núcleos celulares (parte superior más oscura) y la región necrótica (parte inferior más clara). La barra representa 40 μ m.

c) Sinapsis exocéntrica madura en el área cortical del agregado; hay que destacar el buen estado ultraestructural de esta región. La línea horizontal representa 0,25 μ m.

d) Célula glial con cuerpos membranosos degenerativos; algunas células de este tipo están dispersas por el centro necrótico del agregado. Escala de 0,33 μ m representado por la línea.

4.1.2.2. Actividad de los enzimas colinérgicos durante el desarrollo en cultivo.

Se trata de ver la capacidad de desarrollo colinérgico que tienen la retina y el tectum individualmente "in vitro".

En la Fig. 17 se presenta la actividad AChE de la retina y el tectum de pollo durante el desarrollo, en cultivo de agregados preparados con embriones de 7 y 10 días. Estos resultados pueden compararse con los de la Fig. 12 que muestra el desarrollo "in vivo" de la AChE. Hay que considerar que los embriones tienen 7 o 10 días más, respectivamente, que el tiempo de cultivo que se indica en la figura. Aplicando esta corrección se puede ver que en la retina (Figs. 12 y 17, panel superior) los valores en cultivo, son del 30 al 70% de los correspondientes valores "in vivo". En el tectum (panel inferior) los valores son del 20 al 60% de los obtenidos "in vivo" (en agregados preparados con embriones de 7 días). Contrariamente a lo que ocurre en la retina, en el tectum, los valores que presentan más semejanza "in vivo" e "in vitro" son los de los puntos iniciales del desarrollo estudiados.

También en la Fig. 17 hay que observar que en la retina la actividad específica de la AChE aumenta considerablemente durante las 4 semanas en cultivo en los agregados preparados con embriones de 7 días, y de forma equivalente en los agregados de embriones de 10 días. En el tectum se produce un aumento casi constante de la actividad específica cuando se utilizan embriones de 7 días; pero se aprecia una estabilización más temprana en la curva de crecimiento

obtenida con agregados de embriones de 10 días.

En la Fig. 18 se muestran los perfiles de desarrollo de ChAT y como en el caso anterior representa cultivos de agregados, de embriones de 7 y 10 días, en retina (panel superior) y tectum (panel inferior). Si la comparamos con la Fig. 13 y hacemos la corrección de días de desarrollo embrionario normal en el incubador, más días en cultivo, observamos que en la retina los valores de ChAT en cultivo oscilan entre el 55 y el 100% de los obtenidos "in vivo" y aparecen en continuo aumento en los dos casos tratados. En el tectum los porcentajes son mucho más bajos, del 12 al 50% de los valores "in vivo". Además en el caso de los agregados de tectum, la actividad de ChAT aumenta solamente durante los 7 primeros días en cultivo, siguiendo un lento decrecimiento hasta llegar al 12% de los valores obtenidos "in vivo".

El porcentaje de AChE (verdadera) frente a la actividad colinesterásica total se muestra en la Fig. 19. Se observa en ella que el porcentaje de AChE verdadera es muy alto en los tejidos seleccionados, manteniéndose casi constante a lo largo del tiempo. Los cultivos reproducen en este caso lo que ocurre "in vivo" (tanto en agregados de tectum como de retina).

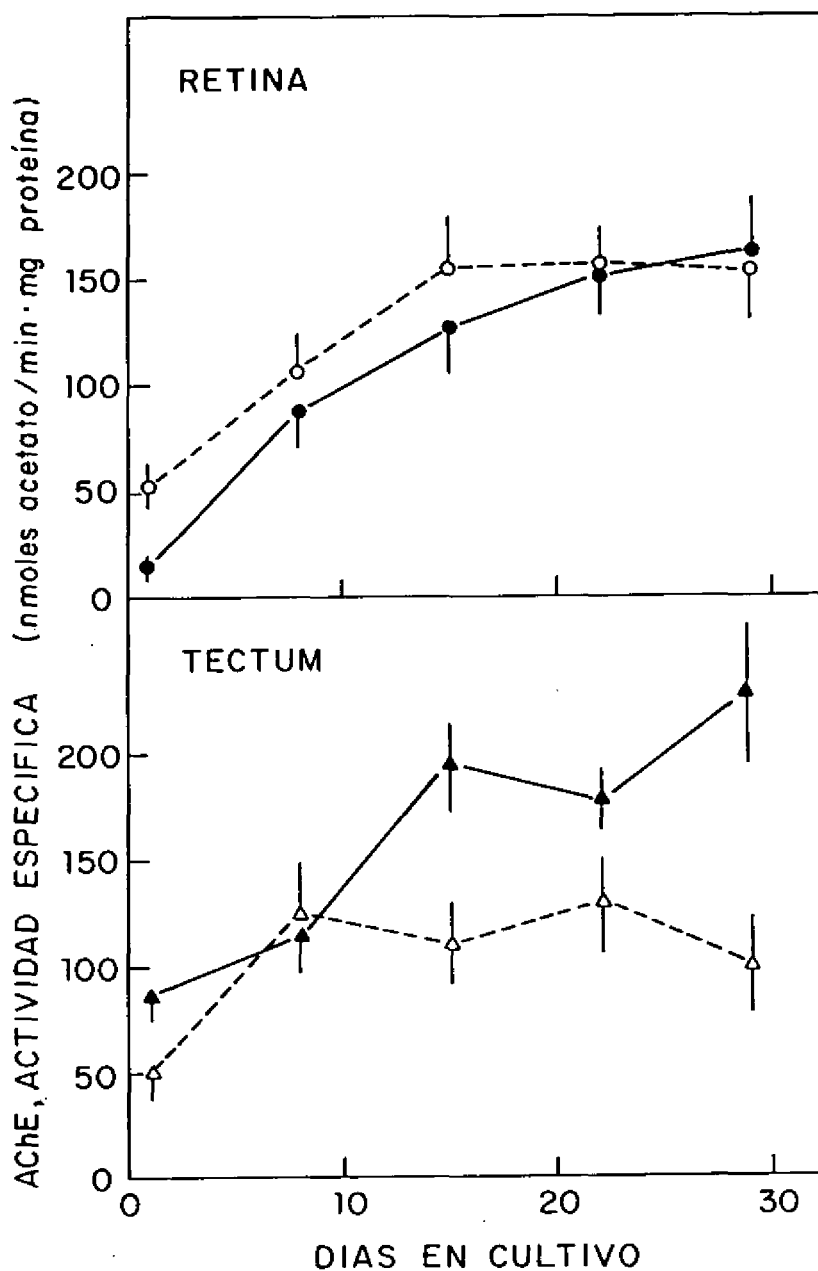


Figura 17.- Perfiles de desarrollo de la actividad específica de AChE en agregados de retina (panel superior) y tectum (panel inferior). Los agregados se preparan con embriones de 7 días (● = retina, ▲ = tectum de 7 días) y 10 días (○ = retina, △ = tectum de 10 días). Cada punto representa la media de 4 valores \pm la desviación estándar.

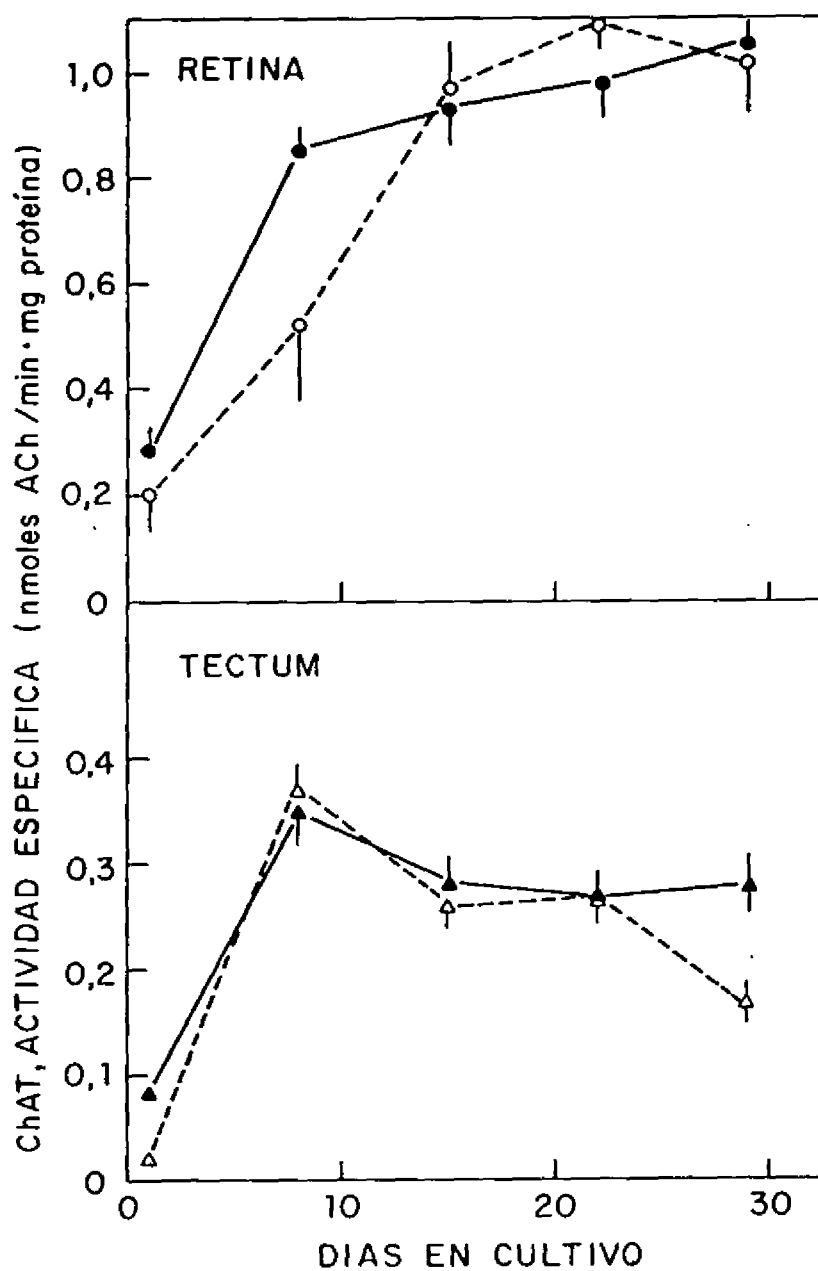


Figura 19.- Perfiles de desarrollo de la actividad específica de ChAT en agregados de retina (panel superior) y tectum (panel inferior). Los agregados procedían de embriones de 7 días (● = retina, ▲ = tectum de 7 días) y 10 días (○ = retina, △ = tectum de 10 días). Cada punto representa la media de cuatro determinaciones independientes \pm la desviación estándar.

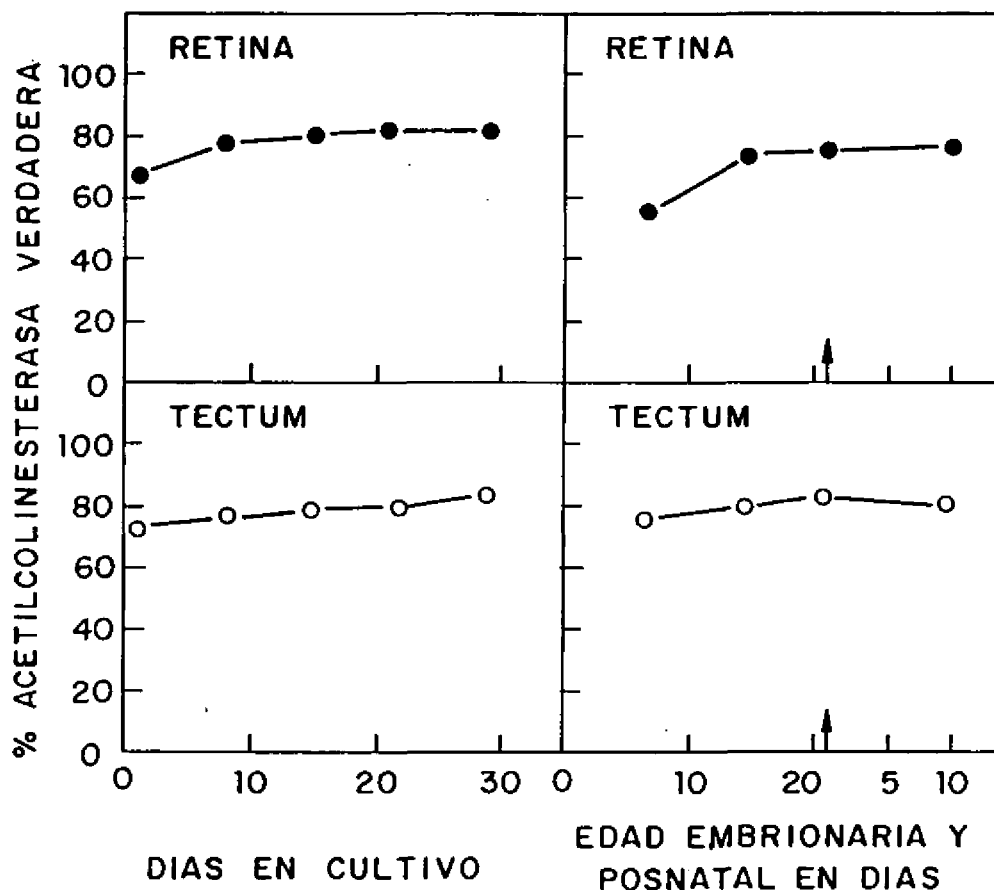


Figura 19.- Porcentaje de AChE verdadera durante el desarrollo de la retina y el tectum "in vivo" (a la derecha) e "in vitro" (cultivos de agregados, a la izquierda). La AChE verdadera fue estimada como actividad colinesterásica sensible a una concentración de $10^{-7}M$ del inhibidor específico dibromuro de BW284 551. A esta concentración solo es inhibida la AChE por lo que se pueden obtener estos valores como diferencia de la medida realizada con y sin inhibidor.

4.2. SOLUBILIZACIÓN "IN VIVO" DE LAS FORMAS MOLECULARES DE ACETILCOLINESTERASA EN RETINA Y TECTUM. COMPARACION CON EL MUSCULO ESQUELETICO.

En los primeros experimentos de solubilización de las formas moleculares de AChE, se utilizaron los procedimientos de extracción descritos en la literatura para el órgano eléctrico de pez torpedo y otros tejidos de vertebrados. En el medio de extracción se ponía sal en alta concentración que se requiere para la extracción de las formas asimétricas (como se indica en la Introducción) y detergente.

4.2.1. Extracción clásica de las formas moleculares de AChE.

En la Fig. 20 se muestran los perfiles de sedimentación obtenidos con este tipo de tratamiento. Retinas o tecta de pollos de 10 días de edad postnatal, extraídos a 4°C, se homogeneizaban en 10 volúmenes de una solución tamponada a pH7 que contenía: Tris-HCl 10mM, NaCl 1M y Tritón X-100 1% . Si bien se observaba que el detergente solubilizaba casi el 100% de la actividad acetilcolinesterásica en el homogenado, sólo aparecía actividad AChE en las fracciones correspondientes a las formas moleculares de coeficientes de sedimentación de 11.1S y 6.1S y una ligera actividad correspondiente a la forma 4.1S. Estos picos (como se muestra en la Introducción) se corresponden con las formas globulares G₂, G₂ y G₁ respectivamente. Los coeficientes de sedimentación se calculan en relación a unos enzimas marcadores internos del gradiente

asa, 159; c: catalasa, 11,99; y f: fosfatasa
alcalina, 6,18).

En la figura se observa la ausencia de formas
asimétricas.

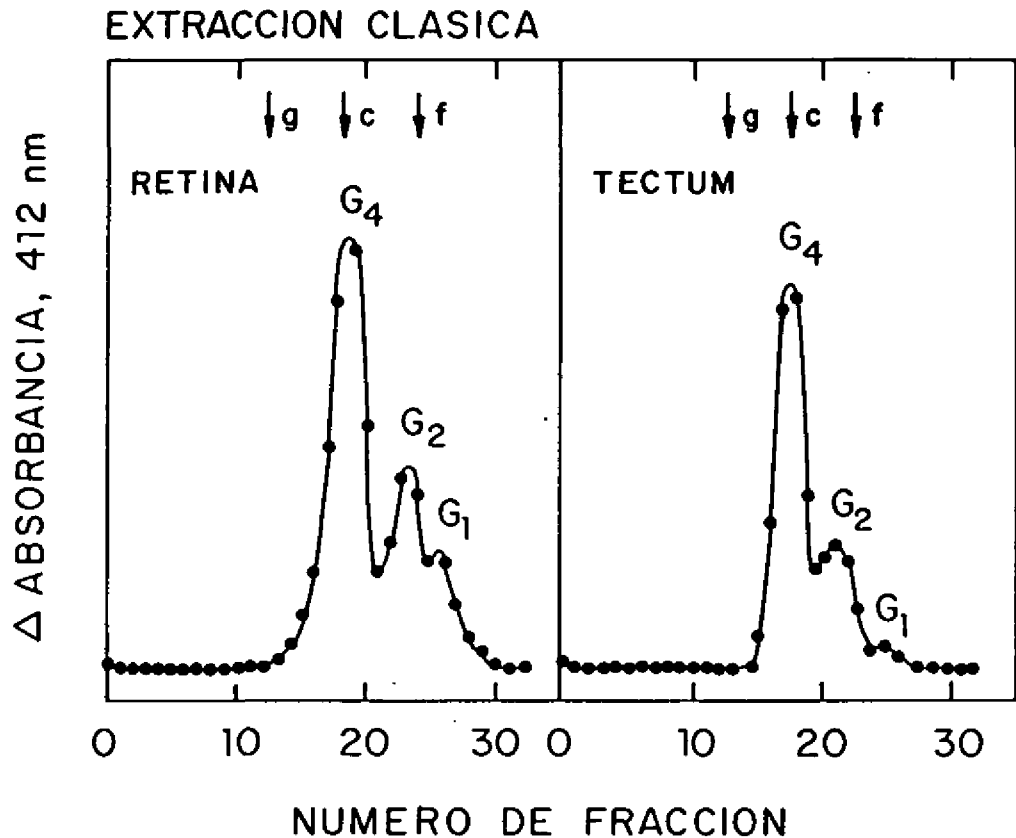


Figura 20.- Perfiles de sedimentación de las formas moleculares de la AChE en la retina (panel izquierdo) y el tectum (panel derecho) de pollos de 10 días de edad postnatal. La extracción del tejido se realizó en un tampón de disociación que contenía Tris-HCl 10mM pH7, NaCl 1M y Tritón X-100 al 1% (v/v). Los sobrenadantes que se muestran eran la suma de dos extracciones del tejido mezcladas (de los que se ponían un alícuota sobre el gradiente). Se analizaron en gradientes de sacarosa del 5 al 20%. La actividad enzimática se expresa en unidades arbitrarias proporcionales al incremento de absorbancia a 412nm. Las muestras se analizaban según el método de detección enzimática de Ellman, 335). En abscisas se indica el número de fracción. La dirección de la sedimentación es hacia la izquierda. Los puntos marcados por las flechas de la parte superior indican la posición de los marcadores internos del gradiente: g, β -galactosidasa (16S); c, catalasa (11,3S); f, fosfatasa alcalina (6,1S).

Este hecho llevaba a pensar que o bien las formas asimétricas no estaban presentes en estos dos tejidos, o que el procedimiento de extracción no era el apropiado para extraer dichas formas. La primera hipótesis estaba excluida por experimentos anteriores realizados en el laboratorio (que se indican en la Introducción), en los que se obtenían derivados de forma A_{12} en el sedimento por acción de la colagenasa. Esto nos hizo continuar en la búsqueda de una solución válida para la extracción de la forma A_{12} intacta.

Conviene añadir aquí, que las formas moleculares que se representan en la Fig. 22 aparecen también cuando se extrae el tejido en ausencia de detergente (en la retina y el tectum). Si se observa, sin embargo, diferencias en cuanto al porcentaje de solubilización. Se produce disminución en el mismo por acción de detergente y también se observa la ausencia en el sobrenadante de las formas G que requieren detergente para su extracción.

4.2.2. Solubilización de formas A_{12} con EDTA.

Si comparamos las Figs. 20 y 21 en las que se muestran los perfiles de sedimentación de la AChE en la retina y tectum de pollo, se observa entre ambas como hecho destacable la aparición en la última (Fig. 21), de una forma de alta velocidad de sedimentación (20S) que se correspondería con la forma A_{12} del enzima. La diferencia de procedimiento entre las dos figuras reside en el hecho de que en el 20 caso se ha

añadido EDTA (K^+ , pH7) en concentración de 2 mM al medio que contenía Tris HCl 10mM; NaCl 1M y Tritón X-100 1%. Aunque ambos procedimientos solubilizan alrededor de un 98% de la actividad total (como se muestra en la Tabla III), en la Fig. 21 se observa un nuevo pico que se corresponde con el 8% de la actividad en el homogenado inicial. Al mismo tiempo, se dan cambios en la distribución de los picos 45 y 65 (formas G_1 y G_2) asociados con la presencia de EDTA en el tampón de homogeneización.

T A B L A III

DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD AChE EN DIFERENTES ESPECIES MOLECULARES EN RELACION CON EL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION.

SOLUCION DE EXTRACCION Y SEDIMENTACION	ACTIVIDAD SOLUBILIZADA	ACTIVIDAD EN LOS DISTINTOS PICOS		
		A _{1±}	G ₄	G ₂ +G ₁
Tris-NaCl	20 ± 2	-	3 ± 1	17 ± 1
Tris-NaCl-EDTA	33 ± 2	7 ± 1	9 ± 1	17 ± 1
Tris-NaCl-Tritón	98	-	52 ± 3	46 ± 2
Tris-NaCl-Tritón-EDTA	98	8 ± 1	58 ± 3	32 ± 2
Tris-NaCl-Colato	98	-	58 ± 3	40 ± 3
Tris-NaCl-Colato-EDTA	98	8 ± 1	58 ± 3	32 ± 2
Tris-NaCl-Tritón-Colato	98	-	63 ± 4	35 ± 2
Tris-NaCl-Tritón-Colato-EDTA	98	7 ± 1	53 ± 3	38 ± 3

Efecto de los distintos medios de extracción en la retina de pollos de 10 días. Los medios utilizados y sus concentraciones son los mismos que los de la Figs. 23 y 24. La actividad total de AChE en cada pico se midió por un ensayo radiométrico como el descrito en Métodos. La caracterización de los picos en el gradiente se hizo por el procedimiento de Ellman. Los valores que se dan resultan de la media ± desviación estandar de 6 a 16 experimentos y se expresan como porcentajes frente a la actividad total en el homogenado inicial.

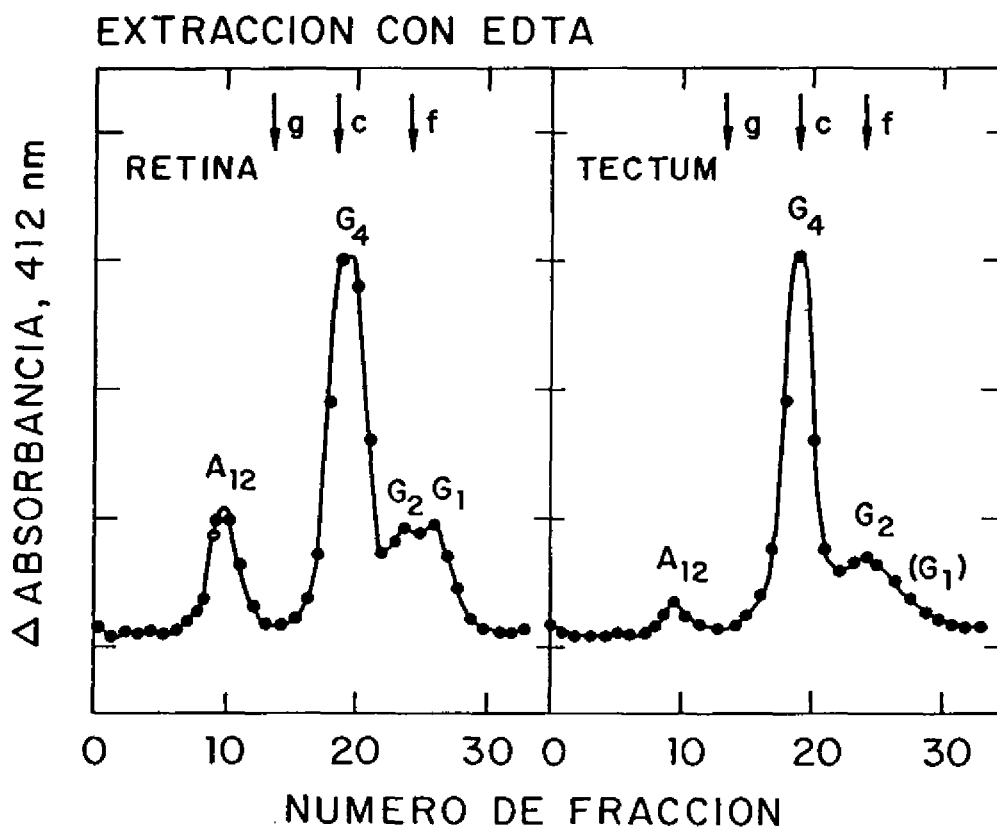


Figura 21.- Perfiles de sedimentación de las formas moleculares de la AChE en la retina y el tectum de pollos de 10 días de edad. La extracción del tejido se realizó en una solución tamponada que contenía Tris-HCl 10mM pH7, NaCl 1M, Tritón X-100 1% (v/v) y EDTA-K₂ (pH7-20°C) 2mM. La mezcla de los dos sobrenadantes correspondientes a sendas extracciones se analizaron en gradientes de sacarosa del 5 al 20%. La estructura cuaternaria que se indica se obtiene en función de sus coeficientes de sedimentación, obtenidos en relación a los de los marcadores internos del gradiente que se representan por flechas en la parte superior de la figura. Otros detalles se dan en la Fig. 20.

aumentar de forma significativa el rendimiento en A₁₂.

4.2.2.1. Acción de la colagenasa sobre la forma A₁₂.

Para confirmar que el pico 20S se debía a la actividad AChE de una forma asimétrica, es decir con cola semejante al colágeno, se trató el pico del gradiente correspondiente a la forma 20S con colagenasa.

Bajo condiciones controladas, la colagenasa produce un aumento de alrededor de 2 unidades Svedberg en el coeficiente de sedimentación de las formas asimétricas de la AChE. Este cambio puede ser explicado porque la pérdida de masa se compensa con un aumento en la simetría de la molécula por escisión de la cola.

El pico 20S extraído con EDTA (correspondiente al gradiente representado en la Fig. 21) se dializó contra una solución que contenía: Tris-HCl 10mM, NaCl 1M y Tritón X-100 al 1% (v:v), esto se hizo con objeto de eliminar la sacarosa y el EDTA. Una parte de la muestra se utilizó como control y la otra se le añadió CaCl₂ 5mM (necesario para la actuación de la colagenasa) y 100 unidades/ml de colagenasa libre de proteínas (tipo VI de Sigma). Ambas muestras se incubaron 30 minutos a 37°C. El resultado de la digestión y la muestra control se pusieron sobre un gradiente de sacarosa del 5 al 20% (Fig. 22: paneles superiores retina, paneles inferiores tectum).

Como se muestra en la figura, por digestión con colagenasa aparece una forma de coeficiente de sedimentación 22S (21,8±0,35) por rotura de la cola del enzima. La presencia de formas 17 y 11S (principalmente en el tectum),

sugiere la existencia de un punto de actuación de la colagenasa, más allá de la zona de separación de los filamentos de la triple hélice dando lugar a fragmentos con 2 y 1 tetrámero, respectivamente.

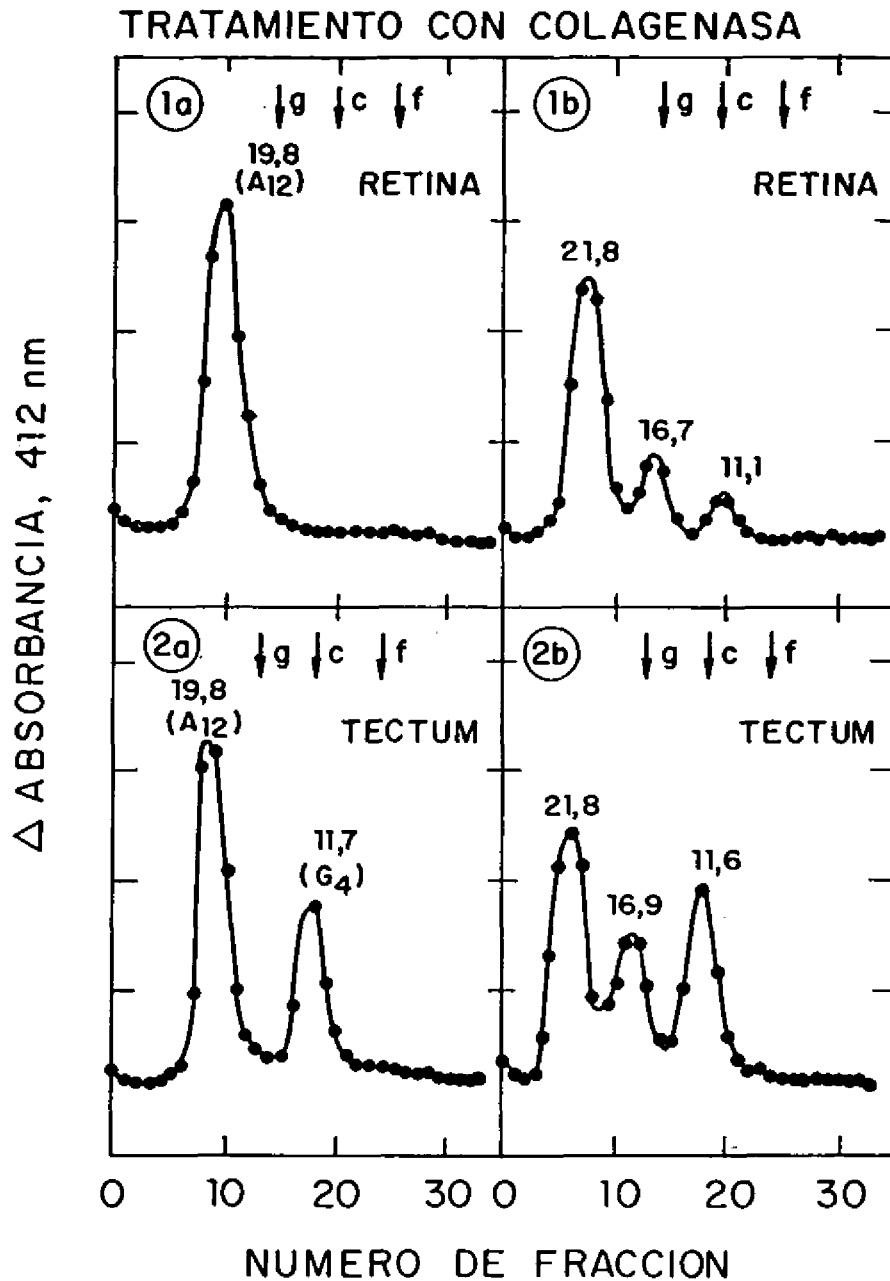


Figura 22.- Efecto de la colagenasa sobre la forma A₁₂ de la retina y el tectum de pollos de 10 días. La solución de extracción contenía Tris-HCl 10mM, NaCl 1M, Tritón 1% y EDTA 2mM. Las fracciones se dializaron contra el mismo tampón sin EDTA. Una parte de la muestra fue utilizada como control (panel 1a = retina; panel 2a = tectum) y otra porción se suplementó con CaCl₂ hasta 5mM y 100 unidades/ml de colagenasa. Ambas muestras se incubaron 30 minutos a 37°C. Las muestras se analizaron en gradientes (panel 1b = retina; panel 2b = tectum).

4.2.3. Efecto de diferentes procedimientos de extracción sobre las formas moleculares de la AChE.

Una vez analizada la acción del EDTA en la solubilización de formas A_{12} de la retina y el tectum del pollo, se pasó a ver el efecto que tenían distintas soluciones de extracción (con y sin detergentes y EDTA), sobre las formas moleculares de la AChE.

Para ello el tejido extraído a 4°C, de pollos de 10 días, se homogeneizó en 10 volúmenes de las soluciones que se indican en las Figs. 23 (retina) y 24 (tectum). En ambos casos las soluciones que se emplearon fueron las mismas y los resultados fueron bastante coincidentes. Los perfiles que se muestran son la suma de dos extracciones sucesivas con el mismo medio.

Se observa en ambos casos que en ausencia de detergente la solución común a todos ellos (que contenía Tris 10 mM y NaCl 1M) sólo solubiliza del 20-30% de la actividad total en el homogenado inicial (que se toma como 100% de actividad) (Tabla III). La presencia del detergente no iónico Tritón X-100, o del detergente iónico colato sódico produce una solubilización prácticamente total del enzima (96 - 102% del homogenado inicial).

Se puede observar en las Figs. 23 y 24 que sólo cuando el EDTA está presente en el medio de solubilización se puede detectar la presencia de formas A_{12} (20S). Por otra parte, como se puede ver en la Tabla III, el detergente no parece aumentar de forma significativa el rendimiento en A_{12} .

De estos experimentos se puede deducir que tanto el EDTA como la alta concentración de sal son requerimientos indispensables para la solubilización de A_{12} y que la presencia de detergente aumenta el porcentaje de solubilización global (hasta casi el 100%) al extraer todas las formas globulares de AChE en estos tejidos. Esto apunta a la existencia de formas B hidrofóbicas en el sistema visual del pollo. No se observaron cambios notables al variar la concentración de EDTA de 1mM a 10mM ni al sustituir el EDTA por EGTA.

Hay que destacar, que la presencia de EDTA y detergente en los medios de homogeneización y sedimentación, afecta también de alguna manera, la distribución de las distintas formas globulares (Tabla III).

En la Tabla IV, se resumen los coeficientes de sedimentación medidos para cada una de las formas moleculares de la retina descritos en las Figs. 23 y 24. Se puede observar que el coeficiente de la forma A_{12} es bastante constante e independiente del procedimiento de extracción y no se ve afectado por los detergentes.

En el caso de las formas B, la presencia de Tritón X-100 durante la centrifugación en gradiente, produce una disminución aparente del coeficiente de sedimentación de 1 unidad Svedberg. Esto sugiere una interacción entre dichas formas globulares (o una subclase de ellas) con el Tritón X-100. En el caso del colato sódico, los datos de que disponemos son más difíciles de interpretar ya que el colato posee la misma eficiencia que el Tritón en la solubilización de formas globulares, pero el coeficiente de sedimentación no

se ve alterado por la presencia de este detergente en el gradiente.

Todos estos resultados se resumen en la Tabla III y en las Figs. 23 y 24.

Además de las soluciones indicadas se han probado otras sustancias, en general detergentes, para extraer la AChE de la retina y el tectum. Entre ellas: N-N'-dimetilamida de ácido oleico al 1%, Lisolectina en concentración de 10mM, CHAPS al 1%, lubrol WX1% y β -D-Octilglucósido 20 mM, todos ellos en solución tamponada de Tris HCl 10mM y en presencia de sal y EDTA. En todos los casos los porcentajes de solubilización fueron prácticamente idénticos a los del Tritón X-100 y el colato sódico y también la distribución en las distintas formas moleculares.

T A B L A IV

COEFICIENTES DE SEDIMENTACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE
ACHE EN FUNCION DE LOS DISTINTOS MEDIOS DE SOLUBILIZACION Y
EXTRACCION.

SOLUCION DE SEDIMENTACION Y EXTRACCION	COEFICIENTES DE SEDIMENTACION (Unidades Svedberg)			
	A_{12}	G_4	G_2	G_1
Tris-NaCl	-	11,7±0,2	7,8±0,2	-
Tris-NaCl-EDTA	19,8±0,1	11,6±0,1	7,6±0,1	(5,4)*
Tris-NaCl-Tritón	-	10,9±0,2	6,4±0,2	4,5±0,2
Tris-NaCl-Tritón-EDTA	19,8±0,2	10,8±0,2	6,5±0,2	4,6±0,2
Tris-NaCl-Colato	-	11,8±0,2	7,6±0,2	(5,4)*
Tris-NaCl-Colato-EDTA	19,8±0,2	11,7±0,1	7,7±0,1	(5,5)*
Tris-NaCl-Colato-Tritón	-	11,0±0,2	6,7±0,2	-
Tris-NaCl-Colato-Tritón-EDTA	19,7±0,2	10,9±0,1	6,9±0,2	(5,0)*

Valores medidos en los coeficientes de sedimentación de las formas moleculares de la AChE en las distintas soluciones descritas en la primera columna. Los valores experimentales son la media de 6 a 16 experimentos ± la desviación estandar. Las diferencias entre los pares homólogos de los valores de las formas 11S y 7S en presencia y en ausencia de Tritón X-100 (con o sin colato) eran significativos con un valor P 0,001 como se estimó por el cálculo de la t de Student.

* Estos picos no estaban bien resueltos por lo que los valores de coeficientes de sedimentación son aproximativos.

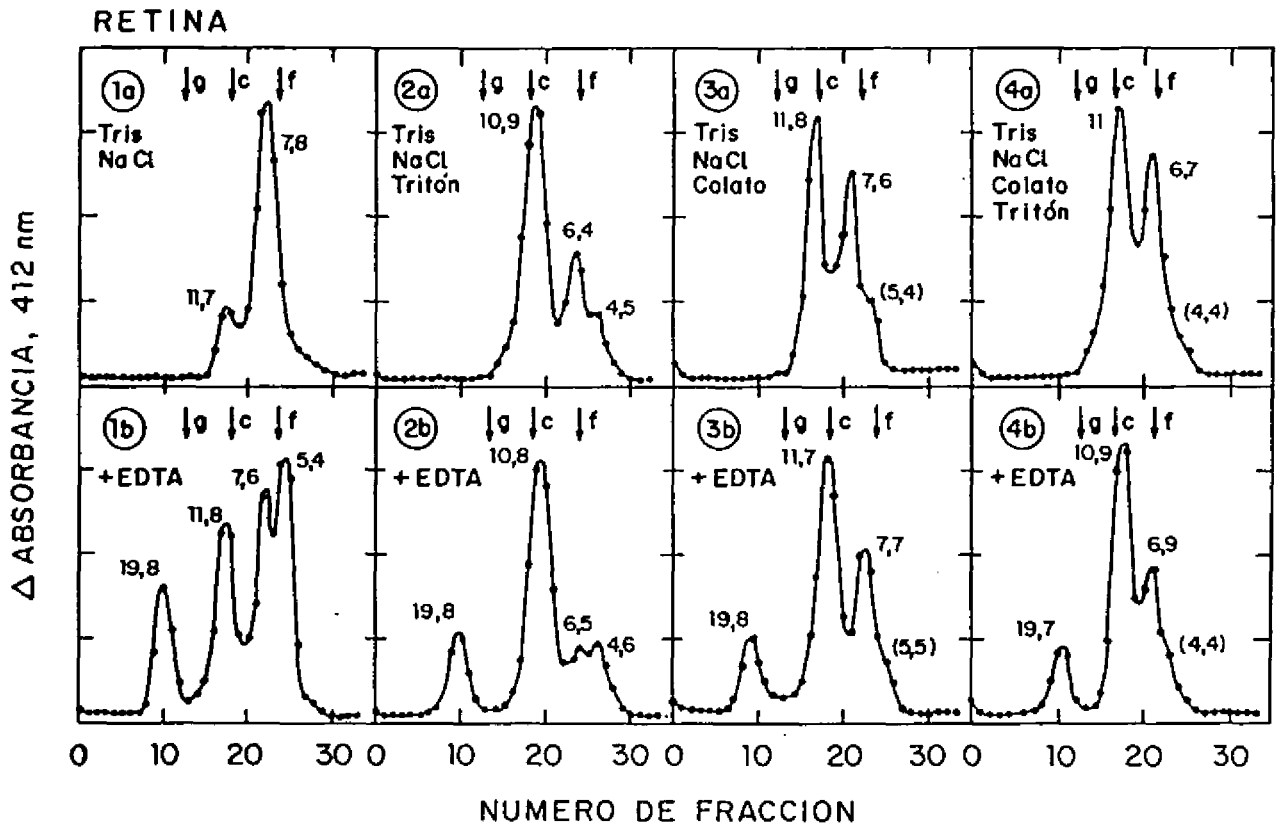


Figura 23.- Perfiles de sedimentación de las formas moleculares de la AChE de la retina de pollos de 10 días. La homogenización se realizó en las soluciones tamponadas que se indican en cada caso, las concentraciones respectivas eran: Tris-HCl 10mM, NaCl 1M, EDTA 2mM, Tritón X-100 1% y colato sódico 1%. Los gradientes de sacarosa utilizados para el análisis se prepararon en la misma solución que la utilizada en la extracción. Las soluciones tamponadas del panel inferior tenían los mismos constituyentes que las del panel superior suplementadas con EDTA. Las formas moleculares se indican por sus correspondientes coeficientes de sedimentación. Otros detalles se dan en la Fig. 20.

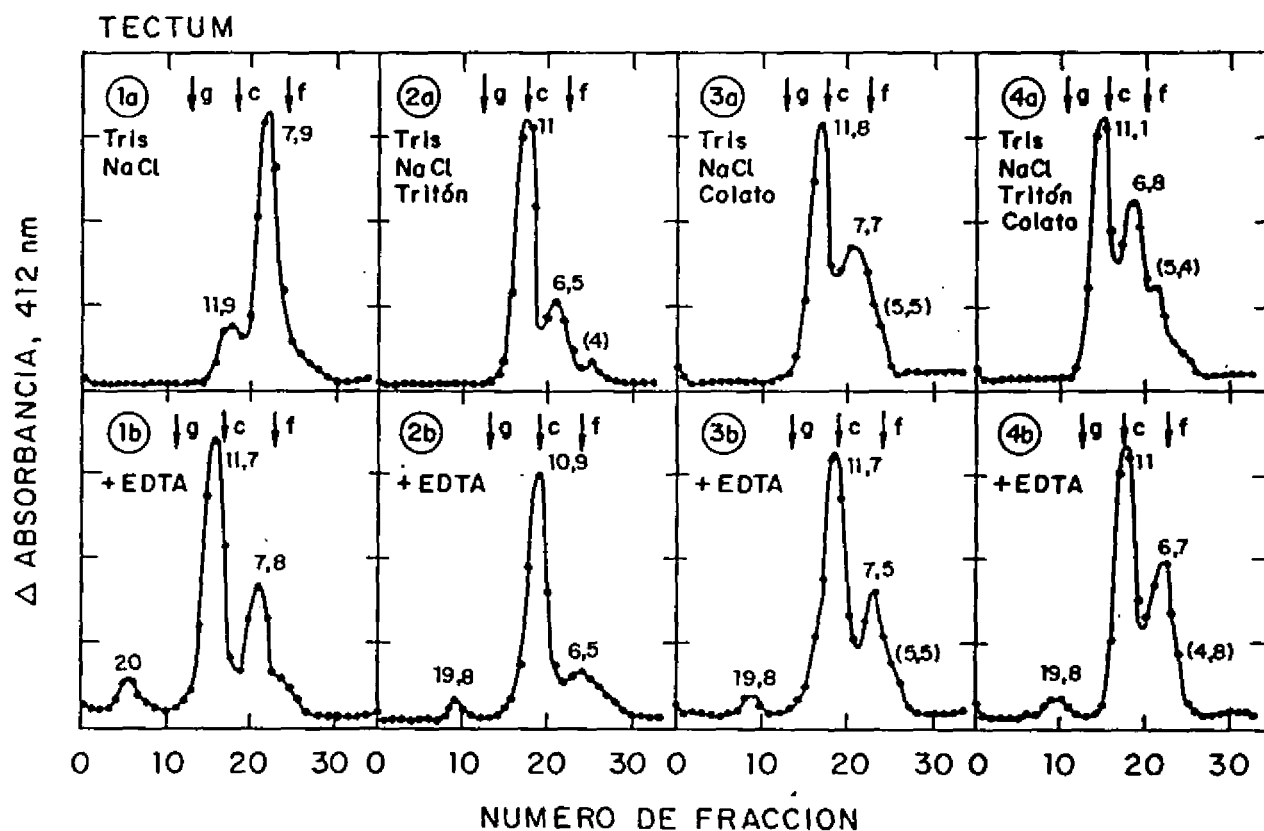


Figura 24.- Perfiles de sedimentación de las formas moleculares de la ACHE del tectum de pollos de 10 días. La homogenización se realizó en las soluciones que se indican en la figura. Los medios de extracción de las figuras del panel inferior eran los mismos que los de sus correspondientes en el panel superior pero con EDTA 2mM. Otros detalles se dan en las figs. 20 y 23.

4.2.4. Acción del Calcio sobre las formas asimétricas.

El hecho de que el EDTA, fuera necesario para solubilizar la forma $A_{1,2}$ de la retina, hizo pensar que la unión del enzima a la membrana se hace en parte por medio de enlaces iónicos. Más específicamente se pensó, que esta unión ocurría por intermedio de cationes divalentes de los cuales los principales candidatos pudieran ser el Ca^{2+} y el Mg^{2+} .

Para confirmar esta hipótesis, lo que se hizo fue homogeneizar el tejido en una solución tamponada, con o sin detergente y EDTA 1mM, a la que se le añadían concentraciones crecientes de Ca^{2+} o Mg^{2+} . Por análisis de sedimentación se encontró, que mientras una concentración de Ca^{2+} 1 mM bloquea la liberación de la forma $A_{1,2}$, se necesita Mg^{2+} en concentración de 10mM para reducir el pico 20S a la mitad y de 40 mM para eliminarlo totalmente. Hay que hacer notar que estos cambios en la concentración de las formas asimétricas del enzima no iban acompañados de un cambio en la actividad total solubilizada. Este hecho junto con resultados anteriores del laboratorio (328), sugieren que cuando la solución de extracción no lleva EDTA o cuando su efecto es bloqueado por cationes divalentes, la forma $A_{1,2}$ es destruida en el proceso preparativo.

Para estudiar mejor el mecanismo de acción del EDTA se añadió Ca^{2+} en las distintas etapas del proceso preparativo descrito (ver Métodos). Ya hemos visto que la adición de Ca^{2+} al medio de homogeneización que contiene EDTA impide la aparición de forma $A_{1,2}$. Esto ocurre tanto si el medio tiene detergente como si no (Tabla V).

T A B L A V

EFFECTO DE LA ADICION DEL CALCIO EN DISTINTOS MOMENTOS DEL PROCESO PREPARATIVO, SOBRE LA RECONVERSION DE LA FORMA A_{12} DE AChE EN RELACION A LA SOLUCION DE EXTRACCION INICIAL.

SOLUCION DE EXTRACCION	ACTIVIDAD A_{12} RECOBRADA COMO TAL EN PRESENCIA DE CALCIO		
	(% A_{12} sobre la del control)	sobre la del gradiente	
	Incluido	Añadido	Añadido
Añadido	en el	después	al
pico	medio de	de la	sobre-
205	homoge-	homoge-	nadaute
aislado	neización	neización	(extracto)
-----	-----	-----	-----
Tris-NaCl-EDTA 50	0	0	0
Tris-NaCl-Tritón-EDTA 100	0	60	100
Tris-NaCl-Colato-EDTA 60-90	0	0-10	60

Las retinas de pollos de 10 días se homogeneizaron en las soluciones de extracción que se indican en la primera columna. En el momento que se indica en cada caso se añadió Ca^{2+} (Cl_2Ca) hasta una concentración final de 3mM. Parte del material se usó como control.

Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad recobrada en el pico de A_{12} en la muestra que contenía Ca^{2+} comparados con la muestra control sin Ca^{2+} . Los resultados son la media de 4 experimentos.

Si el Ca^{2+} se añade después de homogeneizar la retina en distintos medios, solo se detecta actividad remarcable en el pico de la A_{12} en presencia de Tritón. Esta actividad es de un 10% del control sin Ca^{2+} .

Cuando el Ca^{2+} se añade al sobrenadante de la centrifugación a 110000 g no se observaba ningún efecto cuando la solución contenía Tritón. En ausencia de detergente se recupera un pequeño pico de A_{12} (del 10% sobre el control); mientras que cuando se sustituía el Tritón por colato se obtenía un 60% de la actividad del pico 20S en el control.

Finalmente cuando el Ca^{2+} se añadía al pico de la A_{12} aislado, se recuperaba toda la actividad de la forma A_{12} si había Tritón X-100. Con colato se recuperaba casi toda la actividad, y sin detergente aparecía un 50%. Además en este último caso el enzima parecía ser totalmente inestable. El Tritón actuaba como agente "protector" de la forma A_{12} (Fig. 25c) con respecto a la agregación por Ca^{2+} .

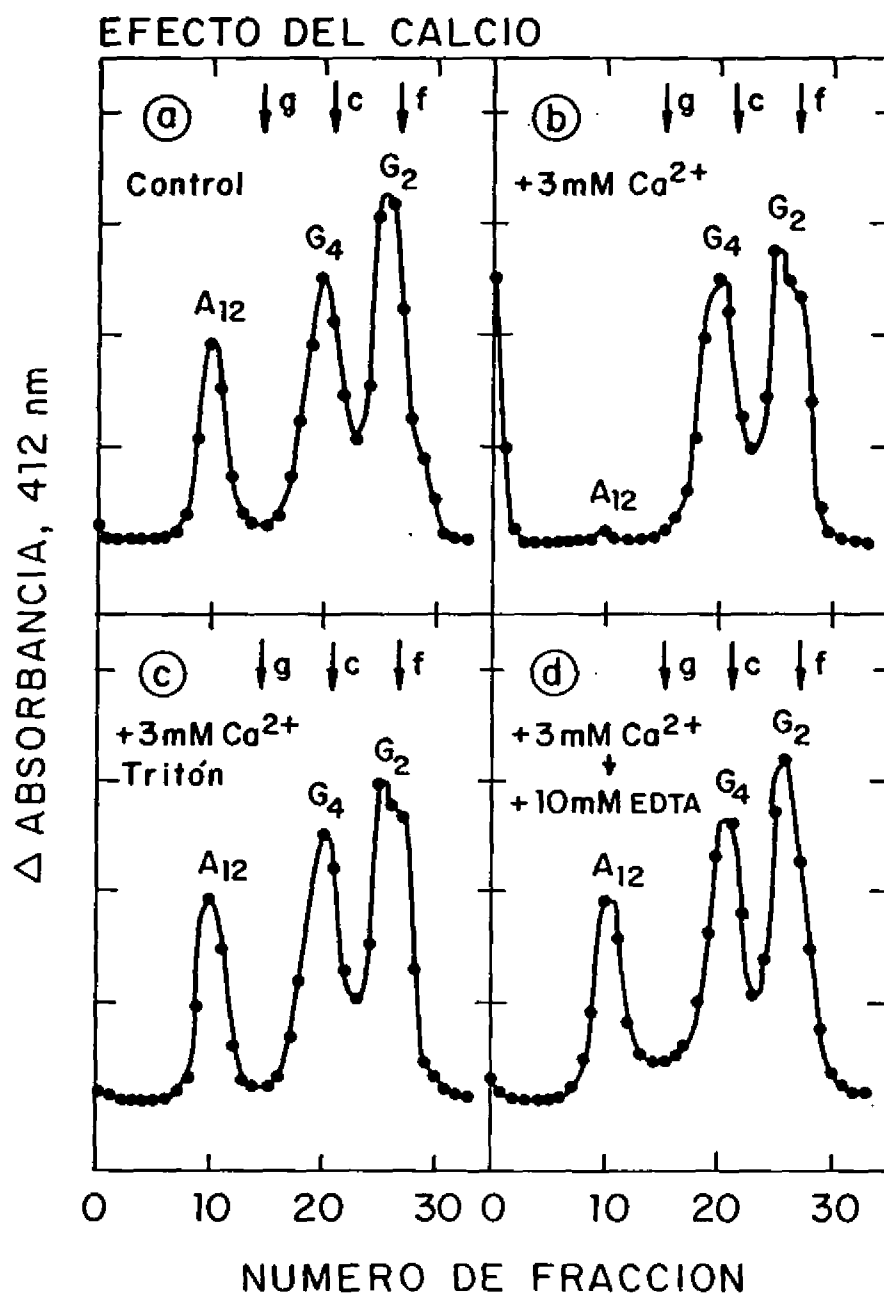


Figura 25.- Efecto de la adición sucesiva o simultánea de Ca^{2+} , EDTA y Tritón X-100 sobre la recuperación del pico A_{12} (20S) de la AChE. El sobrenadante de un extracto de retina obtenido por solubilización con un tampón con sal y EDTA se dividió en 4 porciones: una que se usó como control (panel a); la segunda que se hizo 3mM Ca^{2+} (por adición de CaCl_2 , (panel b); la tercera fue suplementada con Ca^{2+} 3mM y Tritón X-100 al 1% (panel c); la cuarta se hizo 3mM Ca^{2+} y después de 5 minutos, se le añadió EDTA hasta 10mM (panel d). Las 4 muestras se analizaron por sedimentación en gradientes de sacarosa, preparados en la solución de extracción modificada para cada muestra como corresponde.

El EDTA recupera la actividad del pico de A_{12} en las formas descritas anteriormente, es decir, el EDTA es capaz de restablecer la actividad de la forma A_{12} que desaparece después de la adición de Ca^{2+} exógeno. En aquellos casos en que la forma A_{12} ya había sido solubilizada intacta, la presencia de Ca^{2+} promueve la desaparición reversible de las formas con cola (no su destrucción), probablemente por agregación. Además se ha visto que las formas sometidas a la acción de la colagenasa no agregan. Esto parece indicar que el factor de agregabilidad por Ca^{2+} reside en la cola del enzima.

Los efectos de la adición del Ca^{2+} y la acción protectora del EDTA se resumen en la Fig. 25. Se puede ver que el EDTA recupera el pico 20S que había sido solubilizado y posteriormente agregado por acción del Ca^{2+} (esto se observa porque aparece actividad en el fondo del gradiente).

El hecho de que en presencia de detergente y sin EDTA se solubilizara prácticamente toda la actividad AChE, independientemente de que las formas A_{12} no se extrajeran, nos hizo pensar en la posible degradación de esta forma a otras de menor tamaño en ausencia de EDTA. Ello se confirmó en el experimento que se describe en la Tabla VI. Se observa que cuando el EDTA no está presente desde el principio, la forma A_{12} no se solubiliza y después de varias centrifugaciones tampoco se puede recobrar el sedimento por extracción con EDTA. Esto indicaría que la forma A_{12} es degradada a formas globulares en ausencia de EDTA. La pérdida de A_{12} no se puede asignar a ninguna forma θ concreta, ya que el porcentaje de formas θ ($G_4/G_2/G_1$) se ve afectado por la presencia de EDTA.

Los resultados que se han mostrado, utilizando la retina,

se reproducen casi idénticamente en el tectum y en distintas etapas de desarrollo. Las retinas de pollo de 10 días se utilizaron para la puesta a punto del método de solubilización, porque estudios puntuales con las diferentes soluciones de extracción, indicaban un mayor porcentaje de formas en la retina que en el tectum (especialmente en pollos de 10 días). Este hecho se tratará de forma más detallada al hablar de los perfiles de desarrollo.

T A B L A VI

ACTIVIDAD AChE SOLUBILIZADA EN LA FORMA A_{1a}

	<u>Extracción primaria</u>	
	<u>+ EDTA</u>	<u>- EDTA</u>
Primer sobrenadante	4,9	0,40
Segundo sobrenadante	3,2	0,06
Tercer sobrenadante	0,8	0,08
	<u>Extracción secundaria</u>	
	<u>+ EDTA</u>	<u>- EDTA</u>
	0,3	0,30
	<u>Rendimientos en formas moleculares</u>	
% Forma A _{1a} total	9,2	0,84
% Formas B	90,8	99,16

Valores en los porcentajes de actividad de formas A_{1a} en la retina de pollos de 10 días cuando se homogeneizan en Tris-HCl 10mM, NaCl 1M, Tritón X-100 al 1 %. Cuando se añade el EDTA se utiliza en concentración de 2mM. Los homogenados se centrifugaron a 110000xg durante 30 minutos y los sedimentos se rehomonogeneizaron y se centrifugaron otra vez hasta un total de 3 ciclos de la extracción primaria y el sedimento se reestrajó con EDTA. Los sobrenadantes de cada paso se analizaron en gradientes de sacarosa. Los valores representan el porcentaje de actividad de A_{1a} frente a la actividad total de AChE en el homogenado inicial. La parte inferior da el patrón de distribución de las formas A y B totales.

4.2.5. Extracción con EDTA de las formas moleculares de AChE en retina y mesencéfalo de varias especies de vertebrados.

El siguiente objetivo que se planteó era ver si el EDTA solubilizada las formas A en otras especies de vertebrados en las que tradicionalmente se había negado la presencia de formas A en el SNC. Para ello estudiamos ocho especies representativas de los principales grupos y de las que podíamos disponer con más facilidad para nuestros estudios: trucha, rana, tortuga, pollo, erizo, rata, conejo y cerdo. De ellos nos fijamos específicamente en la retina y el mesencéfalo para comparar los resultados con los del pollo.

Para ello las muestras del tejido correspondiente se extrajeron dos veces en una solución que contenía: Iris-HCl 10 mM, NaCl 1M, Tritón X-100 0,5%, colato 0,5% y EDTA 2mM.

La Fig. 26 representa los perfiles de sedimentación de las formas moleculares de AChE en retina y mesencéfalo. Estas figuras representan la suma de las dos extracciones y por lo tanto los picos se corresponden con el total de la AChE. Las distintas formas moleculares se indican por sus coeficientes de sedimentación. Se puede observar, que la sedimentación de éstas varía ligeramente de unas especies a otras, como ya se había indicado en la Introducción. Nuestros resultados en los coeficientes coinciden con los de otros autores (Massoulié y col., 1980, 249).

La Tabla VII indica los porcentajes de actividad solubilizada en formas asimétricas frente a la actividad AChE total. Se puede observar que los rendimientos mejores en la extracción con EDTA se obtuvieron en la retina de tortuga y en

cantidad menor en retina de pollo y mesencéfalo de trucha y cangrejo. Se comprobó que estas formas eran asimétricas tanto por tratamiento con colagenasa, siguiendo el procedimiento descrito para la retina y el tectum de pollo, como por precipitación a baja fuerza iónica.

T A B L A VII

PORCENTAJE DE FORMAS ASIMÉTRICAS EN VARIAS ESPECIES DE VERTEBRADOS.

	<u>% de la actividad total</u>	
	<u>Retina</u>	<u>Mesencéfalo</u>
Trucha	5,5	6,6
Rana	1,8	7,0
Tortuga	26,1	3,1
Pollo	9,2	1,4
Erizo	4,8	0,7
Rata	0,7	0,6
Conejo	1,4	2,1
Cerdo	0,9	0,8

Porcentaje de la actividad de AChE en formas asimétricas. Los resultados se obtuvieron aplicando el procedimiento radiométrico sobre las fracciones de los picos del gradiente frente a la actividad AChE total en el homogenado inicial. Las desviaciones estándar de los valores medios que se indican en relación a 3 experimentos estaban comprendidas entre 0,1 y 2,5.

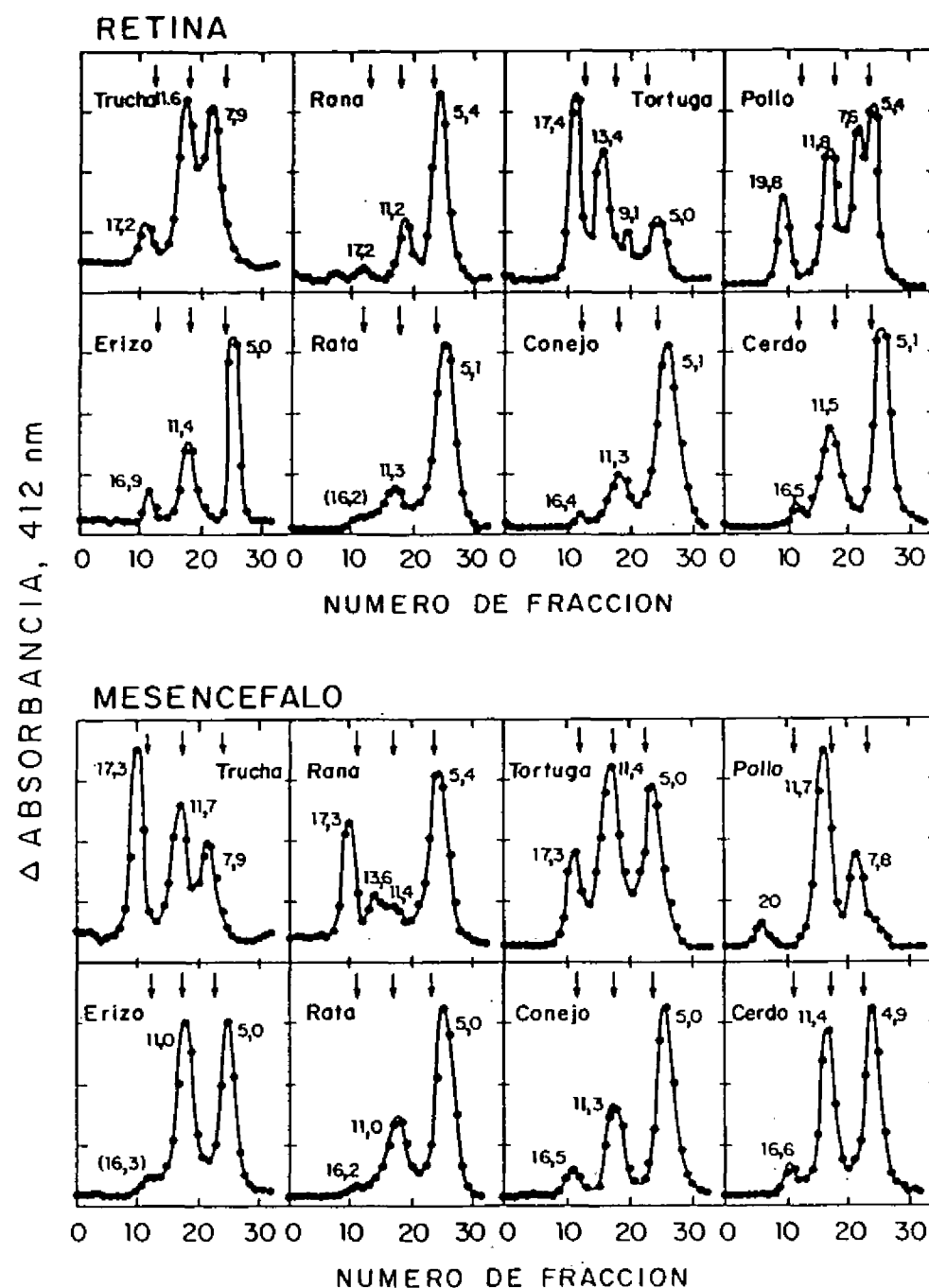


Figura 26.- Perfiles de sedimentación de las formas moleculares de la AChE de la retina y el mesencéfalo óptico de varias especies de vertebrados. El tejido correspondiente de al menos dos animales se extrajo 2 veces, seguidas de centrifugación a alta velocidad, en una solución que contenía: Tris 10mM, NaCl 1M, Tritón X-100 0,5%, colato sódico 0,5% y EDTA 2mM y la mezcla de los 2 sobrenadantes resultantes se pusieron sobre un gradiente de sacarosa del 5 al 20%, preparado en la misma solución. Los picos del gradiente se indican por sus coeficientes de sedimentación, que varían según la especie tratada: de 16,2 a 20S para la forma A_{12} ; de 13,4 a 13,6S= A_8 ; de 11 a 11,8S= B_2 ; 9,1S= A_7 ; 7,6-7,9S= B_5 y 4,9 a 5,4S=.

4.2.6. Extracción de formas asimétricas de AChE en el músculo esquelético de pollo. Existencia de dos clases de formas asimétricas.

El hecho de que la A₁₂ de la retina y el tectum del pollo sólo se extrajera en presencia de EDTA y no por los procedimientos clásicos de extracción descritos por el grupo de Massoulié y otros (228,230,231,232) parecía indicar que el tipo de anclaje del enzima asimétrico en estos tejidos era diferente de los descritos en órgano eléctrico y músculo esquelético, tejidos donde se estudiaron por primera vez las formas asimétricas. Los hechos apuntaban a la implicación de cationes divalentes en este anclaje.

Al comprobar que el EDTA era capaz de solubilizar formas A en el SNC de varios vertebrados nos preguntamos cual sería el efecto del EDTA en un tejido rico en formas asimétricas solubles en IM de sal como es el músculo esquelético. Por lo tanto pasamos a estudiar la extracción de AChE en músculo esquelético de pollo, con y sin EDTA.

Lo primero que hicimos fue disecar el músculo de la parte inferior de la pata y preparar dos muestras que se homogenizan; una en Tris 10mM, NaCl 1M, Tritón X 100 1%; y la otra con la misma solución más EDTA 2mM. Los resultados nos mostraron un aumento de más de 2 veces en el porcentaje de formas asimétricas cuando extraíamos el músculo esquelético del pollo en presencia de EDTA. Esto nos llevó a analizar este problema con más profundidad ya que parecían existir formas A que, como las del SNC no se solubilizaban más que en presencia de EDTA.

4.2.6.1. Extracción secuencial de AChE en el músculo esquelético.

Este tipo de experimento se inició utilizando pollos de 10 días de edad postnatal. Para ello se tomó el músculo de la parte inferior de la pata de al menos 6 animales, con objeto de minimizar los posibles efectos atribuibles a las variaciones individuales. Las muestras se sometieron a un procedimiento de extracción secuencial, teniendo en cuenta que ya era sabido que la sal en concentración 1M extraía cantidades importantes de formas A (323).

El tejido del pollo se homogeneizó en 10 volúmenes de una solución que contenía Tris 10 mM, NaCl 1M, y Tritón X-100 al 1%. El extracto se centrifugó a 110000xg (como se describe en Métodos) y el sobrenadante se separó para el análisis en gradiente de las formas moleculares de AChE. Este procedimiento se repitió tres veces más con la misma solución de extracción que actuaba sobre el sedimento obtenido en las correspondientes centrifugaciones. Todos los sobrenadantes se analizaron en gradientes, independientemente y en conjunto. Tras el cuarto lavado se adicionó EDTA al tampón y se efectuaron otras cuatro extracciones. Este medio de solubilización contenía Tris y sal como el primero y además Tritón X-100 (en este caso al 0,5%), añadiendo además colato sódico 0,5% (p/v) y EDTA 2mM. El colato sódico parece potenciar la acción quelante del EDTA.

En la Fig. 27 se muestran los perfiles de sedimentación de AChE en el músculo esquelético de pollos de 10 días. El panel de la izquierda representa la sedimentación en gradiente

de la mezcla de los cuatro sobrenadantes obtenidos por extracción secuencial con Tris-sal-Tritón. El panel derecho representa las formas obtenidas en las cuatro extracciones siguientes (la suma de ellas) con Tris-sal-Tritón-colato y EDTA.

En la Fig. 28 se representan los porcentajes de formas asimétricas (frente a la actividad total del tejido) extraídas de forma secuencial en las dos soluciones anteriormente citadas. En el músculo esquelético existen formas A extraíbles en ausencia de EDTA, pero también otras formas asimétricas que quedan en el sedimento de la centrifugación de alta velocidad y que se extraen sólo cuando se añade EDTA al medio, como en la retina y el tectum. El análisis de esta figura indica que cuando el medio primario de solubilización ya no extrae prácticamente actividad de AChE asimétrica, la adición de EDTA es capaz de liberar otro subtipo de esta forma. Además, el músculo en estas condiciones parece contener una proporción significativa de la forma A₆.

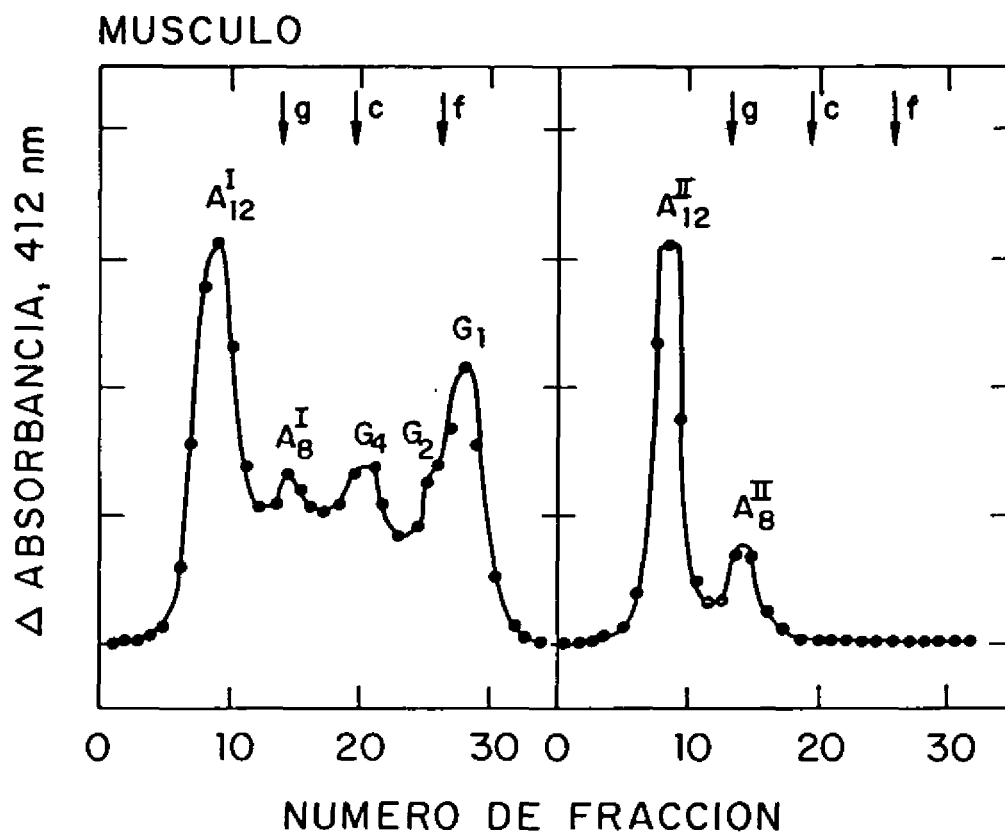


Figura 22.- Perfiles de sedimentación de las formas moleculares de ACNE de músculo esquelético de pollo extraídas de forma secuencial en dos soluciones distintas. Los músculos de la parte inferior de la pata se extrajeron cuatro veces con Tris 10mM, NaCl 1M, Tritón X-100 1% y la mezcla de los 4 sobrenadantes se colocó sobre un gradiente de sacarosa del 5 al 20% preparado en la misma solución (panel de la izquierda) y el sedimento se extrajo otras cuatro veces más en una solución con Tris 10mM, NaCl 1M, Tritón X-100 1%, cloruro sódico 0,5% y EDTA 2mM. La mezcla de estos cuatro últimos sobrenadantes puesta sobre un gradiente de sacarosa es lo que representa en el panel derecho; los coeficientes de sedimentación medidos de las formas moleculares son: $A_{12}^I=19,45$ (ambas clases I y II); $A_8^I=15,15$ (I y II); $G_2=11,03$; $G_3=6,55$ y $G_1=4,55$.

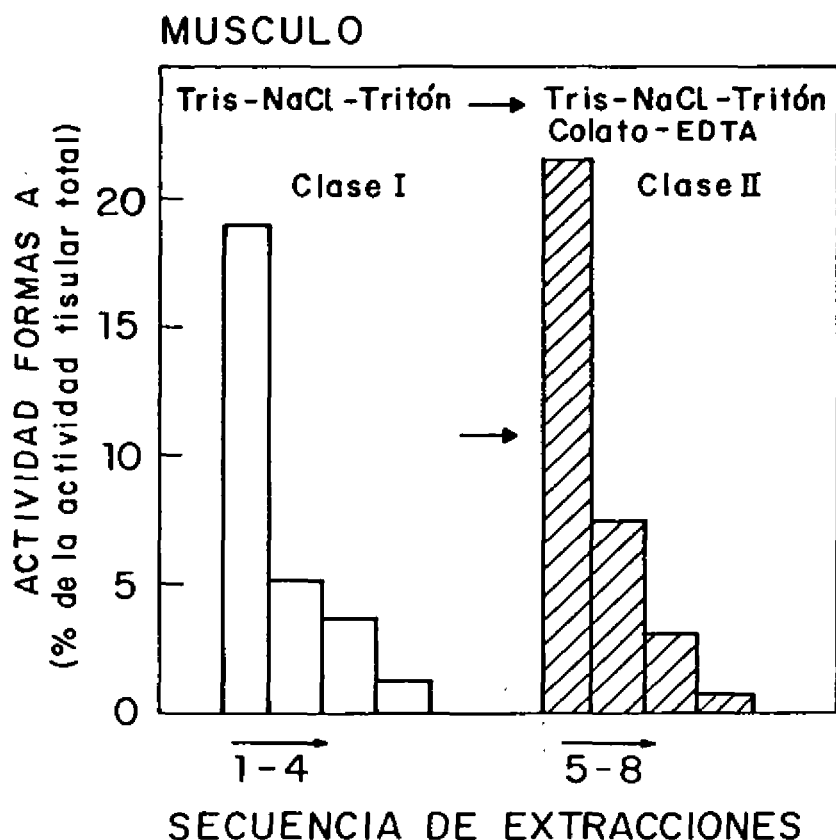


Figura 26.- Porcentaje de formas asimétricas de la AChE de músculo esquelético de pollo extraído de forma secuencial. Los músculos de la parte inferior de la pata de pollo de 10 días se extrajeron en forma de extracciones sucesivas en las soluciones que se indican en la figura (con y sin EDTA, que son las mismas que las de la Fig. 27). Las barras indican el porcentaje de formas asimétricas extraídas en cada paso. Las barras blancas indican porcentaje solubilizado sin EDTA (clase I), las barras rayadas indican actividad solubilizada con EDTA (clase II). Los otros sobrenadantes se analizaron por sedimentación en gradientes de sacarosa. La actividad de las formas asimétricas de cada extracto se ha expresado como el porcentaje de la actividad total del homogenado (tomando como 100% la actividad AChE total del tejido), que se calculó por el procedimiento radiométrico descrito en Métodos.

Esto indicaría que en el músculo esquelético existen dos poblaciones diferentes o clases de formas moleculares asimétricas de AChE. Una de ellas que llamaremos en adelante clase I (A^I), incluye las formas asimétricas convencionales que se pueden solubilizar sin necesidad de EDTA. La otra, clase II (A^{II}), está integrada por las formas asimétricas descubiertas por nosotros, que requieren EDTA para ser solubilizadas y que parecen estar ancladas por medio de puentes iónicos, en los que intervienen cationes divalentes; además de por interacciones sensibles a fuerza iónica alta.

Los coeficientes de sedimentación, medidos en el músculo esquelético, de los picos del gradiente que se muestran en la Fig. 27 son: $A_{1,2}=19,8S$ (en ambas clases I y II); $A_0=15,1S$ (en I y II); $G_4=11,0S$; $G_2=6,5S$ y $G_1=4,5S$. Se puede observar que coinciden con los valores de la retina y el tectum de pollo. Estos valores permanecen constantes durante el desarrollo.

En el caso de las formas moleculares de músculo esquelético de pollo se estudió también el efecto de los detergentes. Se vió que la presencia (o ausencia) de detergente en el medio de extracción no varía el rendimiento en formas asimétricas y sí en las formas globulares y además se observan idénticos efectos en el coeficiente de sedimentación de las formas G, en presencia de Tritón X-100, que los descritos en la retina y el tectum.

Las formas de la clase I se extraían también en los mismos porcentajes que los descritos en la Fig. 28 cuando se añadía Ca^{2+} al medio primario de extracción ($CaCl_2$ 2 mM). Esto resalta más aún, el que las formas A^I no son agregables por acción de cationes divalentes. Se ha comprobado

experimentalmente en nuestro laboratorio por experimentos similares a los descritos en la retina y el tectum, viéndose que las formas A^{12} del músculo esquelético también agregan en presencia de Ca^{2+} (350).

4.2.7. Análisis de las formas asimétricas: clases I y II en el sistema nervioso central de varias especies de vertebrados.

Con los datos aportados por el músculo esquelético de pollo decidimos repetir el estudio de las dos clases de formas A en el sistema retinotectal del pollo y en otros vertebrados. Para ello utilizamos un procedimiento paralelo al descrito en el músculo que consistía en la extracción de dos muestras de tejido. Una de ellas se solubiliza con 10 volúmenes de una solución: Tris 10mM, NaCl 1M, Tritón X-100 al 1% y $CaCl_2$ 2mM. La otra muestra se solubilizaba con Tris HCl 10mM, NaCl 1M, Tritón 0,5%, colato 0,5% y EDTA 2mM. En ambos casos la extracción se repitió tres veces y se juntaron los sobrenadantes antes de la sedimentación. Con la primera de las soluciones descritas se solubilizaban las formas A^1 y con la segunda todas las formas asimétricas (y todas las globulares). Las formas A^{12} se obtuvieron por la diferencia de valores obtenidos por uno y otro procedimiento.

El porcentaje de forma A^1 obtenido en la retina y el tectum del pollo fue menor del 1% de la AChE total. La actividad se caracterizó por ensayo radiométrico de las fracciones correspondientes, aunque la A^1 de retina y tectum de pollo era casi inapreciable en el gradiente, por el procedimiento de Ellman. Estos resultados junto con los de retina y mesencéfalo de otras especies de vertebrados se

muestran en la Tabla VIII.

Se observa que la razón A^2/A^{12} en el pollo es de 0,095 en la retina y 0,08 en el tectum. Este hecho que concuerda con los resultados anteriores en los que no observábamos formas A sin EDTA. Hacen que podamos considerar que las formas asimétricas de la retina y tectum del pollo son formas de la clase II, ya que los valores de actividad de la clase I no son significativos por el bajo número de c.p.m. que se obtienen en el ensayo radiométrico.

En la Tabla VIII se presentan otros resultados obtenidos en el análisis de las formas A en varios tejidos del SNC de algunas especies de vertebrados. Este estudio no ha sido exhaustivo a lo largo de la escala filogenética sino que simplemente, y tras los resultados obtenidos en retina y tectum de pollo, se trató de ver si en alguna estructura del sistema nervioso central existían las dos clases de formas asimétricas. Los resultados que se muestran ponen en evidencia las dos clases de formas A que habíamos descrito en músculo esquelético de pollo. Se indican los porcentajes frente a la actividad AChE total.

Dentro de los tejidos estudiados en las distintas especies podemos ver que en el pollo el cociente A^2/A^{12} alcanza los valores inferiores. En el resto de las estructuras del SNC se encuentra una proporción mayor de formas que no requieren EDTA ya que el cociente es mayor que 1. En músculo esquelético de pollo A^2/A^{12} era aproximadamente 1 en el día 109 del desarrollo postnatal).

T A B L A VIII

ACTIVIDAD ACHE DE LAS FORMAS ASIMÉTRICAS DE LAS CLASES I Y II DE VARIOS TEJIDOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE VERTEBRADOS.

Especie	Tejido	Forma A _{1a} total	Clase I	Clase II	I/II
Trucha	Retina	5,5	4,5	1,0	4,5
	Cerebro*	12,0	8,0	4,0	2,0
	Cerebelo	30,0	22,0	8,0	2,8
Rana	Retina	1,8	1,5	0,3	5,0
	Cerebro*	7,0	5,5	1,5	3,7
	Cerebelo	12,0	8,3	3,7	2,3
Pollo 0,095*	Retina	9,2		0,8	8,4
	Tectum	1,4	0,1	1,3	0,08*
	Cerebelo	0,8	-	0,8	0,0
Conejo	Mesencéfalo	1,6	1,3	0,3	4,33

Muestras equivalentes de los distintos tejidos se extrajeron en una solución con y sin EDTA. Las formas de la clase I se extraían sin EDTA. Las formas de la clase II se estimaron como la diferencia de valores entre la actividad obtenida por los dos métodos.

* El término cerebro indica todo el contenido de la caja craneal excepto el cerebelo.

4.3. DESARROLLO DE LAS FORMAS MOLECULARES DE AChE EN LA RETINA Y EL TECTUM DE POLLO 'IN VIVO'.

Los experimentos del apartado anterior nos aportan datos sobre el anclaje de las distintas formas y en general sobre su solubilización, que vamos a aplicar al conocimiento del desarrollo de la retina y el tectum.

El estudio de estos tejidos en pollos de diez días nos indicó que las formas asimétricas son, prácticamente en su totalidad, formas de la clase II. Otro hecho notable eran los distintos porcentajes de solubilización de AChE con y sin detergentes. Como ya vimos que éste no variaba el rendimiento en formas A, se podía sugerir que la extracción de un mayor porcentaje de AChE con detergente se debía a la solubilización de formas G hidrofóbicas, es decir, de formas G que requieren detergente para su extracción (G^P).

Con estas premisas decidimos abordar el estudio de las formas asimétricas y globulares de la AChE durante el desarrollo embrionario (desde el día 8º) y postnatal (hasta el día 20º) en la retina y el tectum del pollo.

4.3.1. Solubilización sin EDIA.

Los primeros estudios de desarrollo se realizaron con una solución de extracción "clásica", descrita en la literatura para el órgano eléctrico de los peces eléctricos. Los perfiles de sedimentación en las distintas etapas del desarrollo analizados se muestran en las Fig. 29 (retina) y 30 (tectum) en las que el tejido de al menos dos animales de la edad embrionaria o postnatal correspondiente se homogeneizaban en

10 volúmenes de una solución que contenía: Tris 10mM, NaCl 1M y Tritón X-100 1% . Los mismos resultados se obtuvieron añadiendo Mg^{2+} ($MgCl_2$ 50mM) que era el método de extracción clásica utilizado por la mayor parte de los investigadores (228,229,232,233).

En los dos tejidos estudiados se observa la aparición de al menos dos picos de actividad AChE correspondientes a las formas G_4 o 11B ($10,9 \pm 0,40$ en la retina y $10,85 \pm 0,34$ en el tectum) y la forma G_2 o 6S ($6,40 \pm 0,2$ en la retina y $6,20 \pm 0,34$ en el tectum). En algunos casos un pico 4S adicional aparece asociado al pico 6S. Se puede ver por este análisis que la actividad durante el desarrollo de la retina se distribuye de forma bastante uniforme entre G_4 y G_2 . En el tectum gran parte del aumento en actividad AChE es a expensas de la forma G_4 . Se puede observar además que no se detectan formas A durante el periodo de desarrollo considerado, es decir, formas A de clase I, solubles en sal.

RETINA

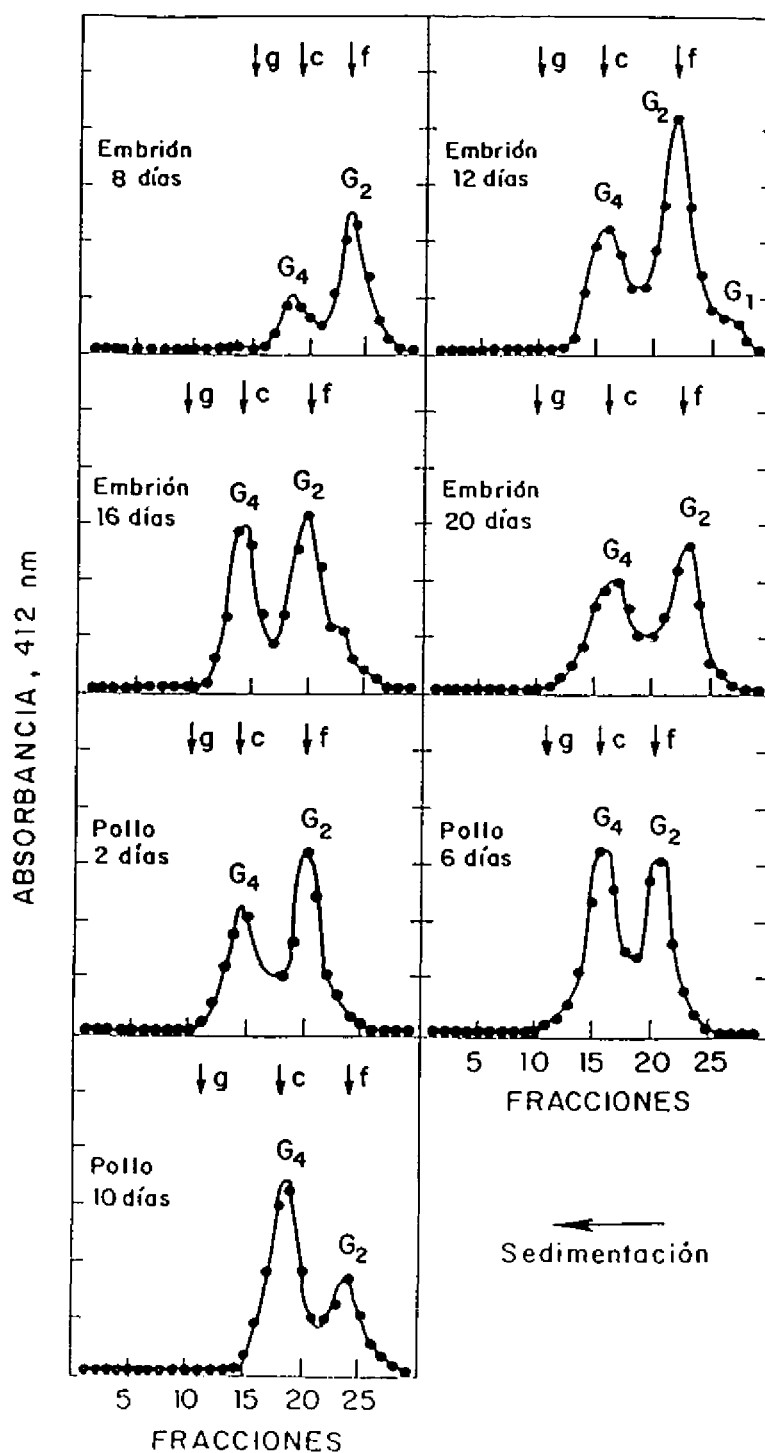


Figura 29.- Perfiles de sedimentación de las formas moleculares de AChE de la retina durante el desarrollo embrionario y postnatal del pollo. Las retinas del al menos dos animales se homogeneizan en una solución que contiene Tris-HCl pH7, NaCl 1M y Tritón X-100 1% (v/v). La actividad enzimática se determinó según el método de Ellman (335). Los valores en la ordenada indican el incremento de absorbancia a 412 nm. La escala que se usa es arbitraria con el fin de acomodarla al amplio rango de valores cuantitativos medidos a lo largo del periodo de tiempo considerado. En la abscisa se representa el número de fracciones del gradiente.

4.3.2. Solubilización de formas asimétricas con EDTA.

El análisis de formas moleculares de AChE durante el desarrollo del sistema retinotectal del pollo se repitió en una segunda etapa con una solución de extracción que contenía EDTA en virtud de nuestros hallazgos ya descritos. Además incluimos en el estudio el punto de 1 día de edad postnatal, pues como ya se ha indicado la apertura de los ojos genera notables modificaciones en el sistema visual. Completamos este estudio de formas A y B con pollos de 180 días (6 meses), para ver los niveles de AChE en el pollo adulto, cuando, es de suponer, han alcanzado el "estado estacionario".

En la Fig. 31 se muestran los porcentajes de distribución de la actividad AChE, en las distintas formas moleculares, incluyendo ahora formas asimétricas en proporción significativa. Así pues en el sistema retinotectal, a lo largo del desarrollo, la presencia de EDTA se confirma como necesaria para solubilizar las formas A, que son por tanto formas de clase II, como ya hemos comentado en secciones precedentes.

El análisis cuantitativo completo de la distribución de la AChE entre las distintas formas moleculares se muestra en las Figs. 32 a 34. Se puede observar que en los dos tejidos estudiados del sistema visual de las aves, el mayor porcentaje de actividad lo constituyen las formas globulares. A lo largo de todo el desarrollo en el tectum y del desarrollo postnatal en la retina, el mayor crecimiento lo experimenta la forma G₂; siendo la forma mayoritaria durante el desarrollo postnatal y en los pollos de 3 meses de edad.

El porcentaje en formas asimétricas $A_{1,2}$ sufre un crecimiento casi constante en la retina (con valores siempre inferiores al 10% de la actividad AChE total). En el tectum el crecimiento se dá únicamente entre los dos primeros puntos de desarrollo estudiados, permaneciendo luego en proporción casi constante e incluso disminuyendo (valores menores al 1%) en pollos adultos. Los resultados de las formas de menor coeficiente de sedimentación, G_2 y G_1 se dan juntos debido a que, en la mayoría de los casos, era muy difícil discriminar los dos picos como entidades individuales en el gradiente de sacarosa.

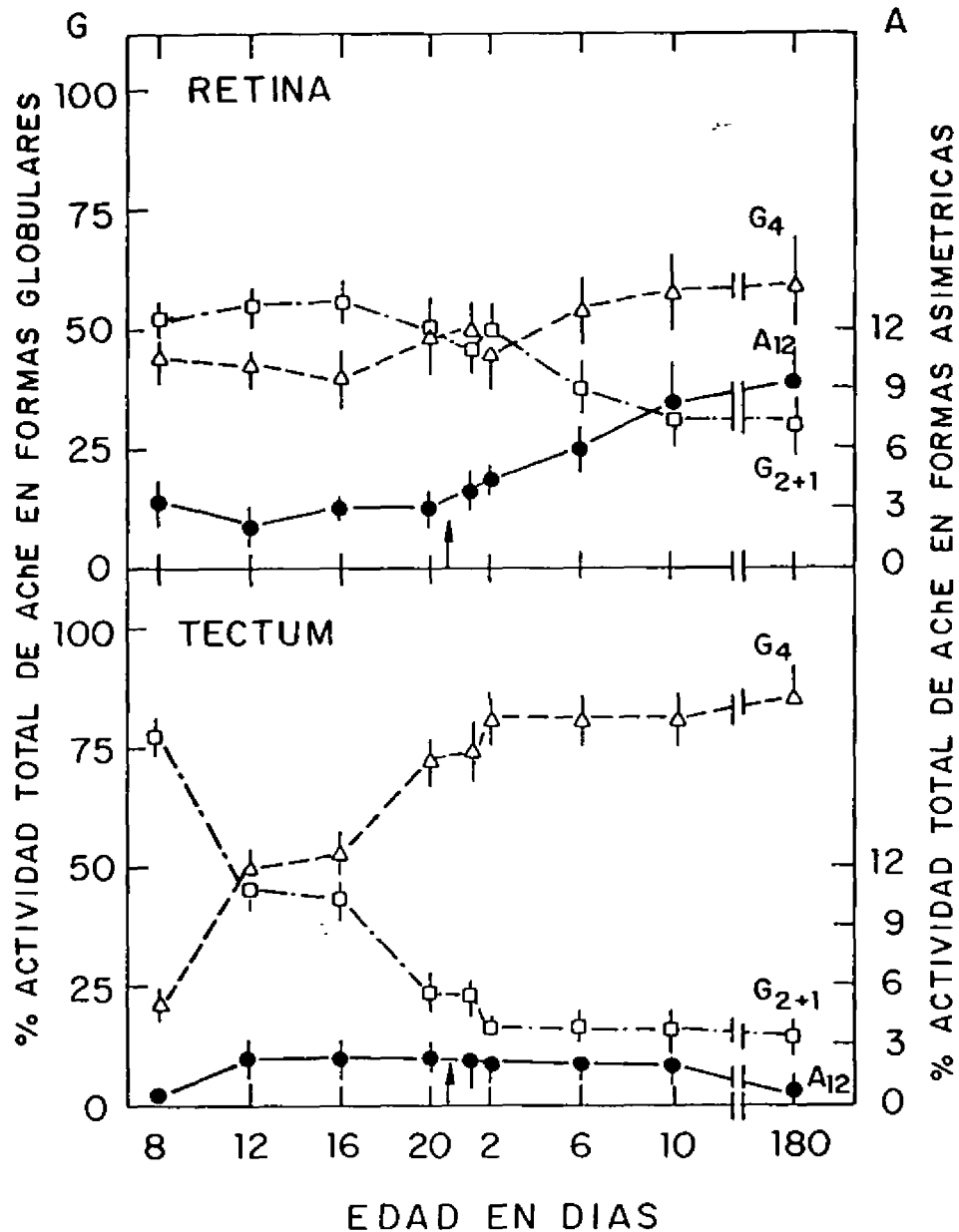


Figura 31.- Porcentaje de las formas asimétricas y globulares de AChE de pollo frente a la actividad total en el homogenado. Retinas y tecta, de al menos dos animales de la edad indicada en cada punto, se homogenizan en una solución que contiene: Tris HCl 10mM pH7, NaCl 1M, cloruro sódico 1% (p/v) y EDTA 2mM. La extracción se repitió y la suma de los dos sobrenadantes se pusieron sobre un gradiente de sacarosa. Los porcentajes se calculan por el procedimiento radiométrico, tomando los picos del gradiente correspondientes a cada forma molecular. El panel superior muestra los resultados obtenidos en la retina y el panel inferior muestra los resultados correspondientes al tectum. Los puntos y barras indican el valor medio \pm D.E. de cuatro determinaciones independientes (en ambos casos $\bullet = \%G_{2+1}$; $\Delta = \%G_4$, y $\square = \%A_{12}$).

La actividad específica de las formas moleculares de la AChE expresada en nmoles de acetato/min.mg de proteína se muestra en la Fig. 32. Se aprecia, en general, un aumento de prácticamente todas las formas durante el desarrollo embrionario, que se estimula con la abertura del ojo, para luego disminuir más o menos bruscamente durante el desarrollo postnatal.

La Fig. 33 representa los resultados obtenidos con respecto a la actividad AChE total en cada una de las formas, en la retina y el tectum del pollo. Se obtiene un aumento no siempre gradual de las actividades totales de las formas de AChE en los dos tejidos, las cuales alcanzan su valor máximo en el pollo adulto (excepto la $A_{1,2}$ del tectum).

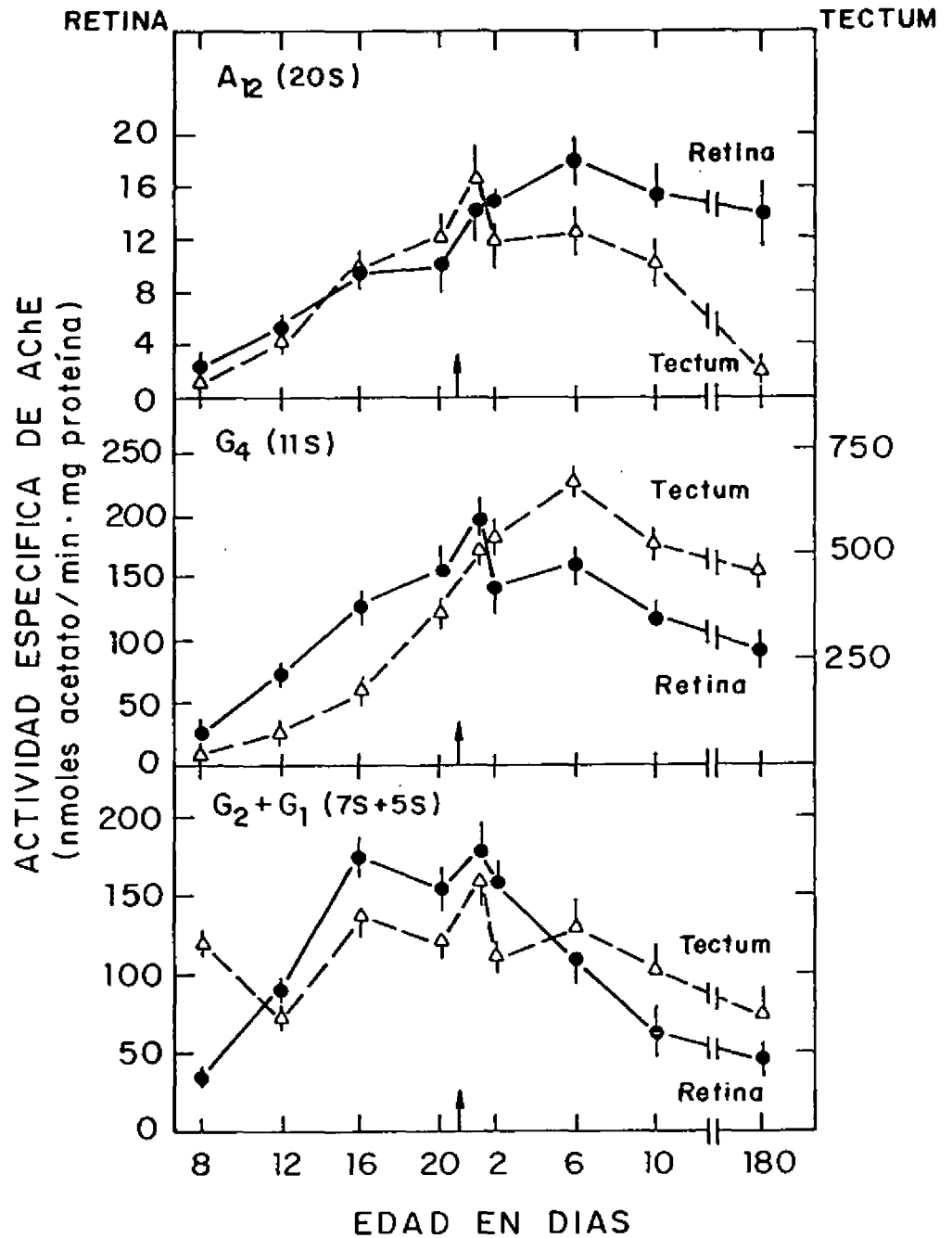


Figura 32.- Actividad específica de las formas moleculares de AChE en la retina (●) y el tectum (△) del pollo durante el desarrollo embrionario y postnatal. La actividad específica se expresaba como nmoles de acetato formados/minuto/mg de proteína del tejido. Los valores de la cantidad de proteína utilizados se muestran en la Fig. 11.

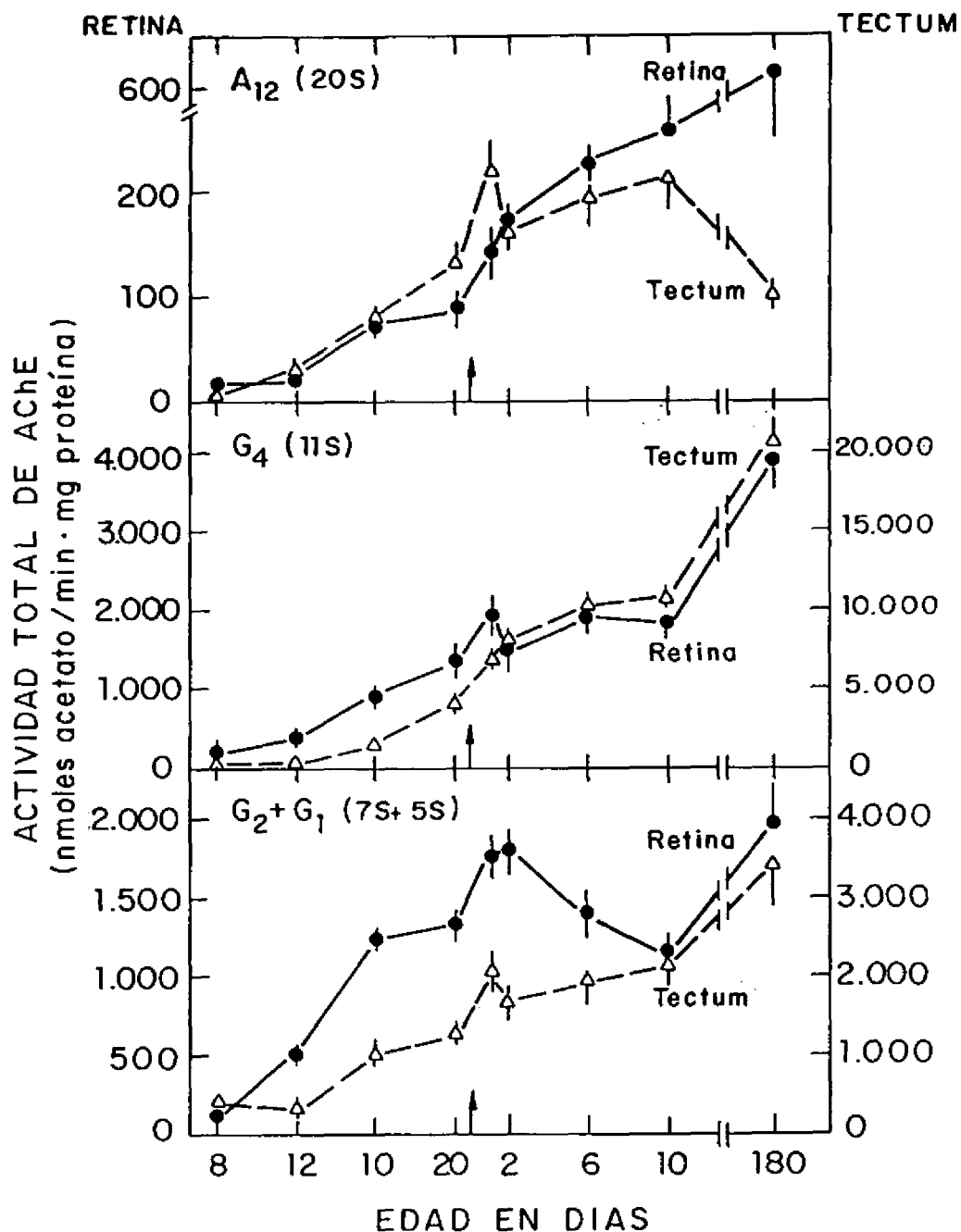


Figura 39.- Perfiles de la actividad total de AChE en las distintas formas moleculares, A₁₂, G₄ y G₂+G₁. La actividad en cada una de las formas se representa en nmoles de acetato/min en la retina (●) y el tectum (△). Los puntos y barras representan el valor medio ± D.E. de 4 determinaciones independientes.

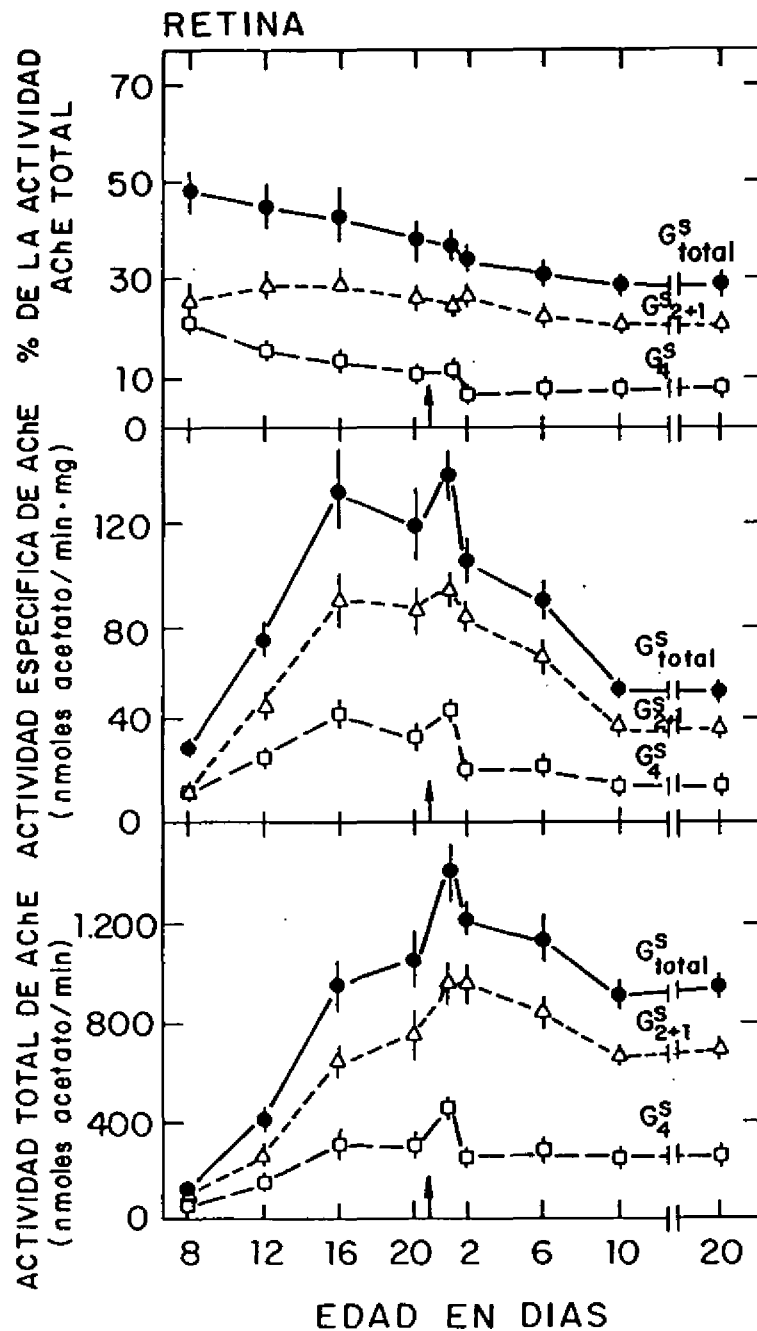


Figura 39.- Perfiles de desarrollo de las formas G^s de la AChE de la retina del pollo. Los resultados que se muestran por los puntos y barras son la media \pm D.E. de 5 o más determinaciones realizadas por los procedimientos de extracción que se citan en el texto. Los valores se dan, como porcentajes de la actividad AChE total (panel superior); actividad específica en nmoles de acetato/min·mg de proteína total del tejido (panel medio); actividad AChE total en dichas formas (panel inferior). En todos los casos: ● =formas G^s totales; * =formas G^s tetraméricas; Δ =formas G^s diméricas y monoméricas.

4.3.3. Presencia de formas globulares hidrofóbicas e hidrofílicas durante el desarrollo de retina y testis.

Hasta ahora en los estudios de solubilización de formas espectulares de AChE nos hemos fijado de forma especial en las

formas asimétricas; en contribuir a un mayor conocimiento de las mismas obteniendo el método óptimo de extracción. Estas formas son sin duda "interesantes" desde el punto de vista fisiológico. Pero el hecho de que en el SNC y en los vertebrados más superiores, las formas G sean las mayoritarias y también en nuestro sistema de estudio concreto, justifica un estudio más detallado de estas formas moleculares y de su evolución a lo largo del desarrollo, con el fin de aportar datos sobre el papel fisiológico y/o localización celular del enzima.

En las tres Figs. anteriores (31,32 y 33) los porcentajes de formas G que se muestran son los totales. Para ver si en la retina y el tectum de pollo existían diferencias de solubilidad dentro de estas formas y la distribución de las mismas durante el desarrollo, realizamos un estudio más detallado con el fin de separar y cuantificar las formas G^{*} (solubles en baja concentración de sal) y las G^P (que requieren detergente para su solubilización).

Los resultados que se muestran a continuación se obtuvieron utilizando tres procedimientos de extracción diferentes para solubilizar las formas hidrofóbicas y en cada caso se repitieron al menos dos veces, por lo que cada punto de desarrollo considerado es el resultado de 6 o más experimentos. Hay que añadir que el concepto de hidrofobicidad varía de unos autores a otros, por lo que es mejor hablar de formas que requieren detergente para su extracción.

Los tres procedimientos usados fueron:

A) En primer lugar utilizamos un procedimiento indirecto en que las formas G^P se obtenían de la diferencia entre las formas G totales (que se muestran en las Figs. 31,32 y 33) y las formas G que obteníamos al extraer el tejido sin detergente.

$$G^P = G \text{ total} - G^*$$

Para ello se homogenizan las retinas o tectas, de al menos dos animales de la edad embrionaria o postnatal considerada, en una solución tamponada a pH 7 con Tris HCl 10mM, NaCl 1M y EDTA 2mM. La extracción se repetía dos veces y se juntaban los sobrenadantes, que se ponían sobre un gradiente de sacarosa del 5 al 20%. De esta forma se solubilizaban las formas A (por el EDTA y la sal), y las G^{*}, ya que las G^P no se pueden extraer sin detergente.

B) En segundo lugar el procedimiento que utilizamos era un método directo de extracción de G^P para ello la retina, o los lóbulos tectales se extraían cuatro veces. (seguidos de sendas centrifugaciones a 110.000xg):

- 1 y 2 se hacían en 20 volúmenes de un tampón que contenía Tris-HCl 10mM, NaCl 1M y EDTA 2mM; con estos lavados solubilizabamos la forma A, y las formas globulares solubles del tejido.

- El sedimento de la 2ª centrifugación se extraía en Tris HCl, para quitar la sal y el EDTA que no se necesitan para extraer las formas globulares.

- El 3º sedimento se reextraía con Tris 10mM y cloruro sódico 1%. Así obteníamos las formas hidrofóbicas que poníamos en el gradiente.

C) Con el tercer método también obteníamos directamente formas G^P por extracción del tejido también en cuatro veces:

- En el primer lavado se solubilizaba con Tris HCl 10mM y

EDTA 2mM, así eliminábamos el Ca^{2+} del medio y protegíamos la A_{12} (Tabla VI), a la vez que solubilizábamos las formas G^S .

- El sedimento de la centrifugación a alta velocidad se extrae con Tris HCl 10mM, NaCl 1M y EDTA 2mM. Así se extraen todas las formas que quedan en el sedimento excepto las G^D .

- La última extracción se realizaba con Tris 10mM, EDTA 1mM y colato 1%. Esto era lo que se ponía en gradiente. La misión del EDTA en este caso era ver si realizaba un efecto protector o solubilizador de las formas G^D .

Los resultados sobre los dos tipos de formas globulares se detallan en las Figs. 34 - 39 (formas G^S , G^D en la retina y el tectum del pollo). Los valores obtenidos por los tres procedimientos muestran una dispersión muy pequeña. Con el 3º procedimiento descrito es con el que se obtenían los resultados más reproducibles.

La Fig. 34 muestra la distribución de la actividad AChE en formas globulares solubles en la retina del pollo. El panel superior representa el porcentaje de dichas formas. En el panel medio se muestra la actividad específica y en el panel inferior la actividad total. Los valores que se dan son el total de formas globulares solubles sin detergente y la distribución entre formas G_4 (tetraméricas) y $G_2 + G_1$. Las formas G_2 y G_1 se dan unidas porque la actividades de los dos picos aparecen unidas en el gradiente. Dichos valores se obtienen por el procedimiento radiométrico que se cita en Métodos, tomando las fracciones del gradiente que presentaban actividad. Las distintas formas se discriminan por sus coeficientes de sedimentación).

De forma análoga a lo que se ha indicado en la Fig. 34 de las formas G^S de la retina, en la Fig. 35 se muestra la actividad de G^D también en retina de pollo. En las Figs. 36 y 37 se muestran los resultados paralelos en el tectum de las formas G^S y G^D_4 , respectivamente.

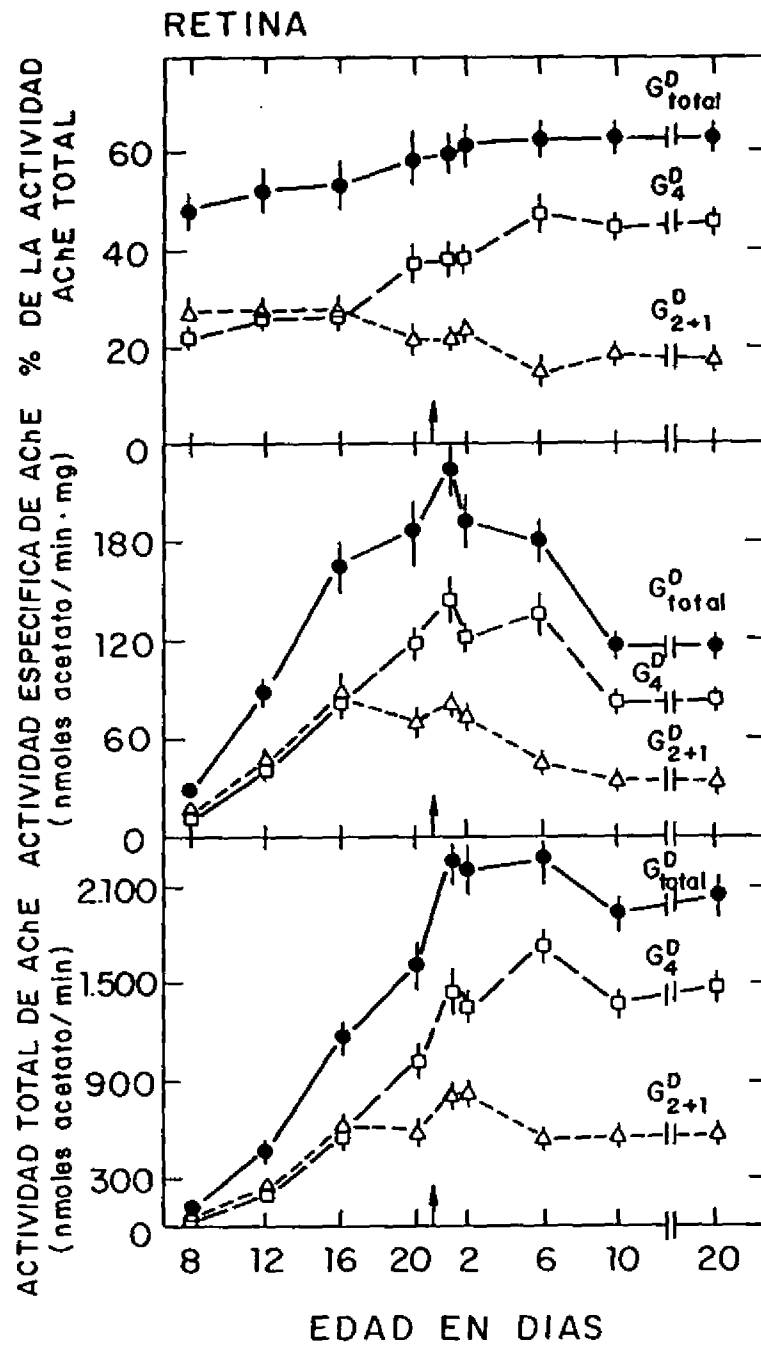


Figura 95.- Perfiles de desarrollo de las formas G^D de la AChE en la retina del pollo. Los resultados que se muestran son la media \pm D.E. de 5 o más experimentos independientes. Otros datos se dan en el texto y en la Fig. 34. \bullet = formas G^D_{total} ; \square = formas G^D_4 , y Δ = formas G^D_{2+1} .

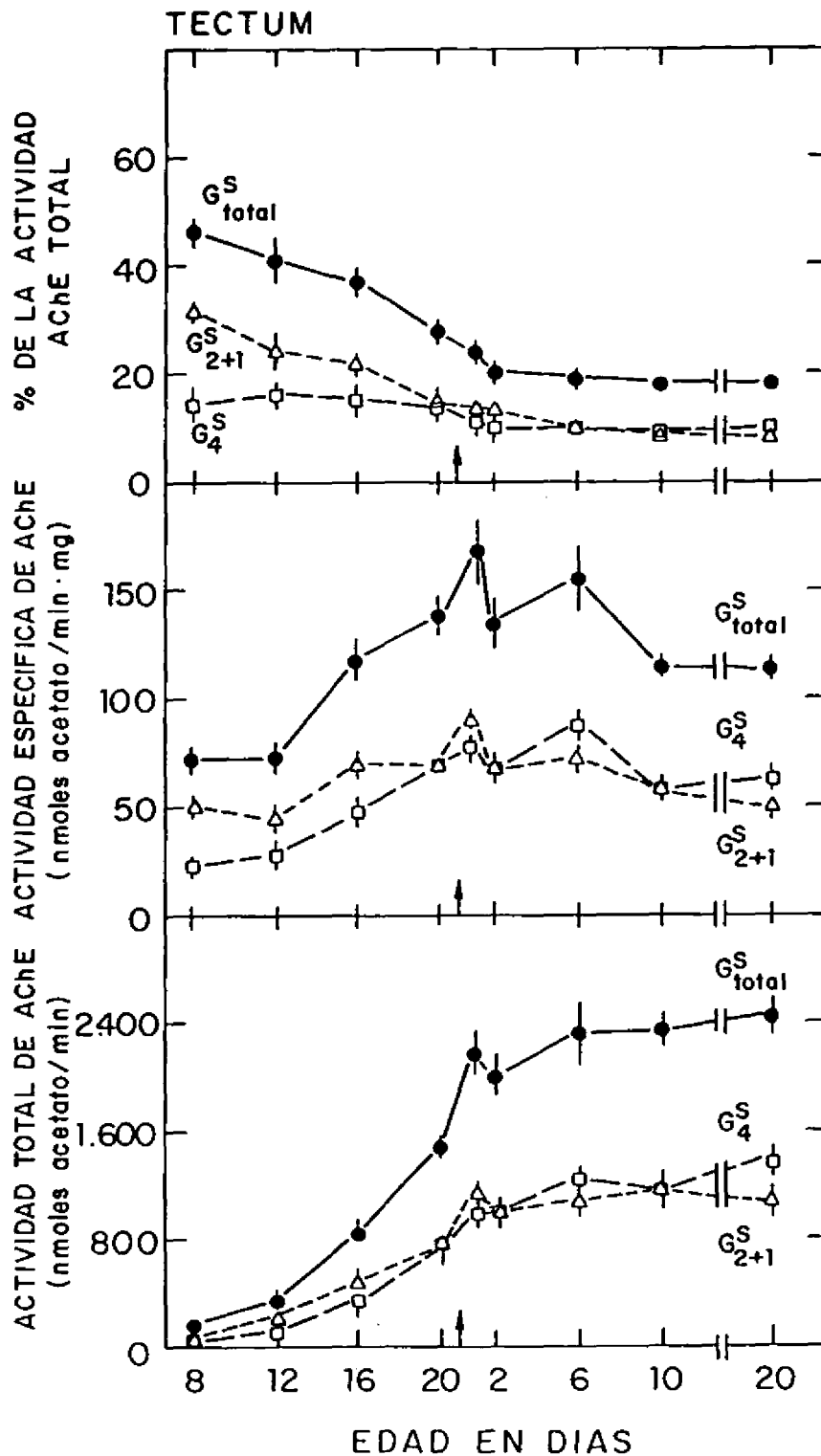


Figura 35.- Perfiles de desarrollo de las formas G^S de la AChE (a) tectum de pollo. Los resultados que se muestran en forma de puntos y barras representan el valor medio \pm D.E. de 6 o más determinaciones. \bullet = formas G^S_{total} ; \square = formas G^S_4 , y Δ = formas G^S_{2+1} . Otros datos se indican en la Fig. 34.

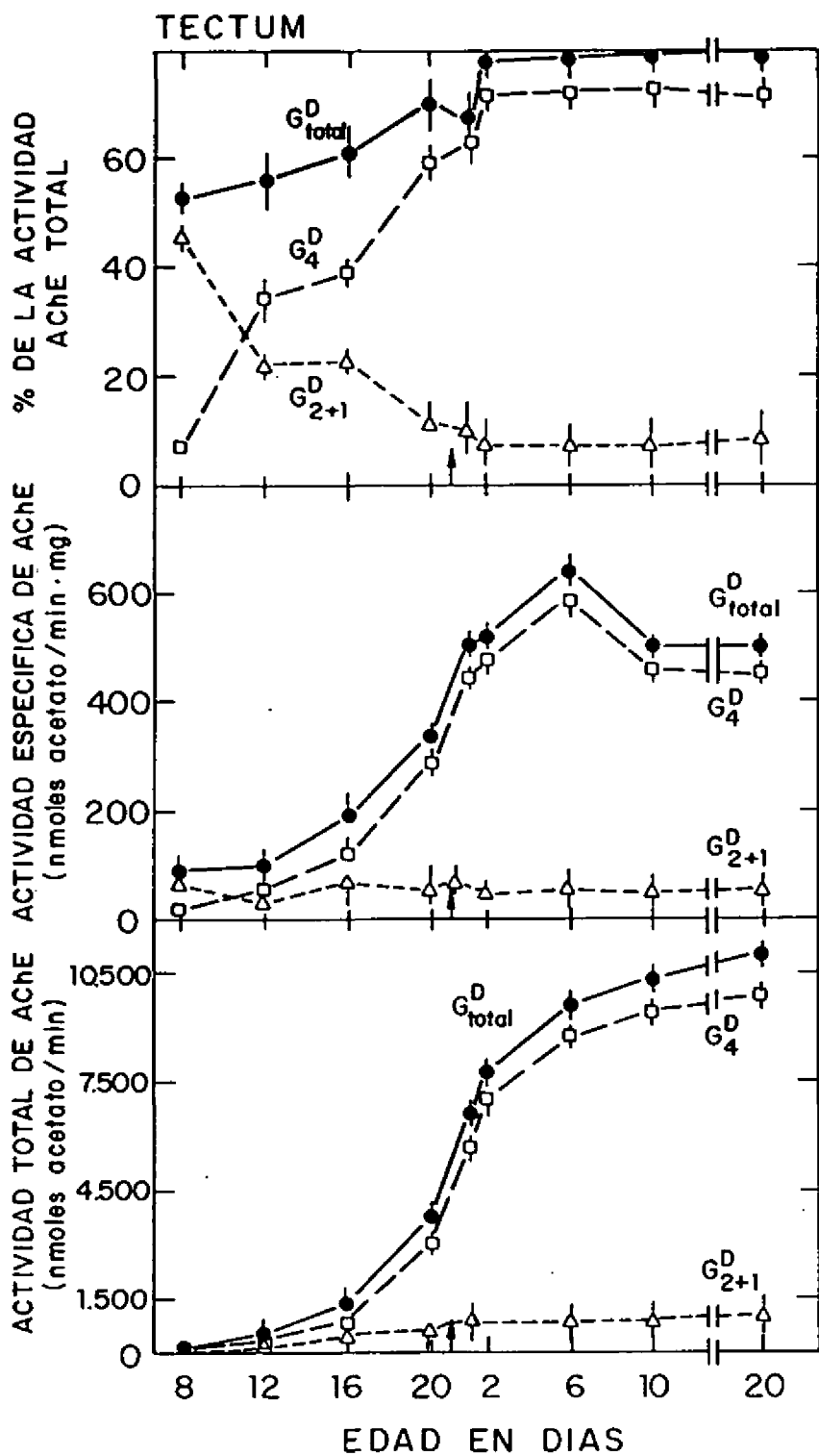


Figura 37.- Perfiles de desarrollo de las formas G^D de la AChE del tectum del pollo. Los resultados representados por puntos y barras indican la media \pm DE. (3)

Como vimos al hablar de las formas globulares, el porcentaje de las mismas aumenta durante el desarrollo. Para saber qué tipo de formas predominan, lo que se hizo fue ver la relación entre las formas G^S y G^D . Estos datos se resumen en las Fig. 38 y 39 derivadas de las 34 a 37. En la Fig. 38 hemos representado la relación entre los dos tipos de formas globulares a lo largo del desarrollo de la retina. Se puede observar que en la retina la razón G^S/G^D disminuye durante el periodo de desarrollo considerado; siendo próxima a 1 en el día 8º de desarrollo embrionario (es decir, $G^S=G^D$) pero en los últimos días considerados (10º y 20º postnatal) la relación de formas solubles frente a los que requieren detergente es de 0,47, es decir las formas G^D representan algo más de 2/3 de la actividad distribuida en formas G de la retina. El predominio de formas globulares que requieren detergente a lo largo del desarrollo representa principalmente la forma G_4 . En la figura se puede ver que la curva G_4 es la que más se aleja decrecientemente, del valor 1.

La representación de las formas diméricas y monoméricas no sigue una pauta definida. La relación se mantiene próxima a 1 e incluso se produce un ligero y no constante aumento de la proporción de formas $G_{2,1}$ solubles sin detergente.

La Fig. 39 muestra la relación entre formas G^S y G^D durante el desarrollo del tectum en pollo, desde el 8º día embrionario al 20º postnatal. Se observan unos perfiles parecidos a los obtenidos en la retina. Se puede ver una disminución constante de G^S/G^D durante el desarrollo embrionario llegando a estacionarse en el 2º día de desarrollo postnatal.

El cociente de las formas de menor velocidad de sedimentación sufre variaciones continuas alrededor del valor 1.

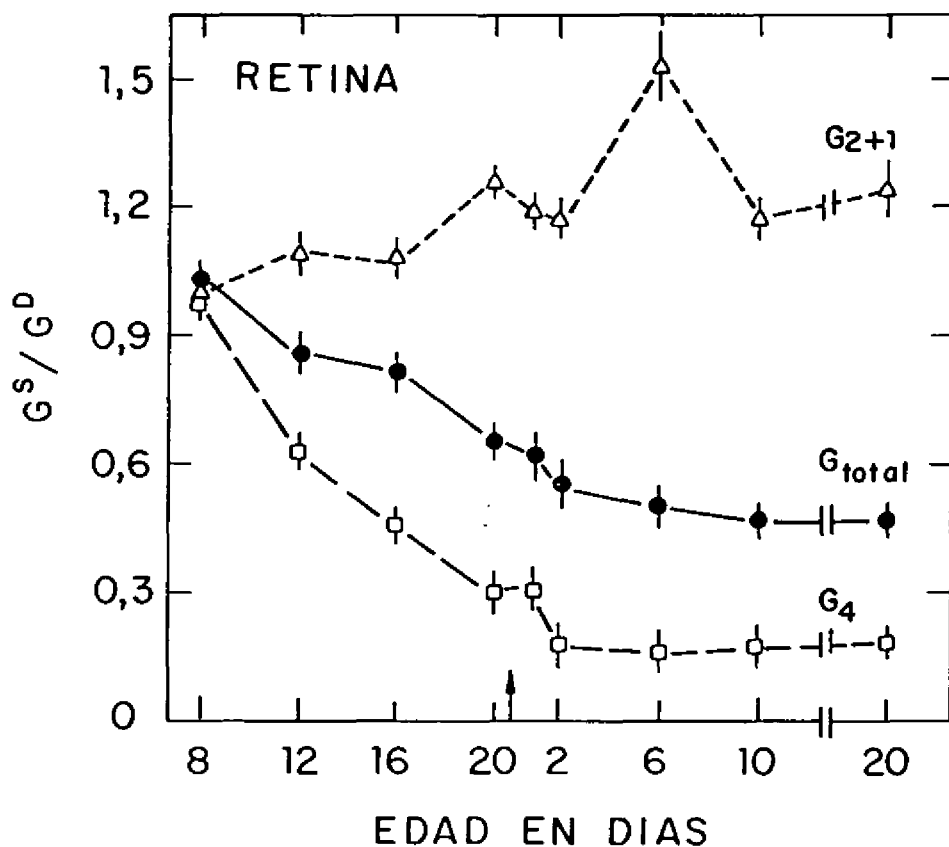


Figura 39.- Relación a lo largo del desarrollo entre las formas G^S/G^D en la retina del pollo. Los resultados representan el cociente de los puntos que se muestran en las figs. 34 y 35, en cada estado del desarrollo considerado.

● = G_{total}^S/G_{total}^D ; □ = G_4^S/G_4^D y △ = G_{2+1}^S/G_{2+1}^D .

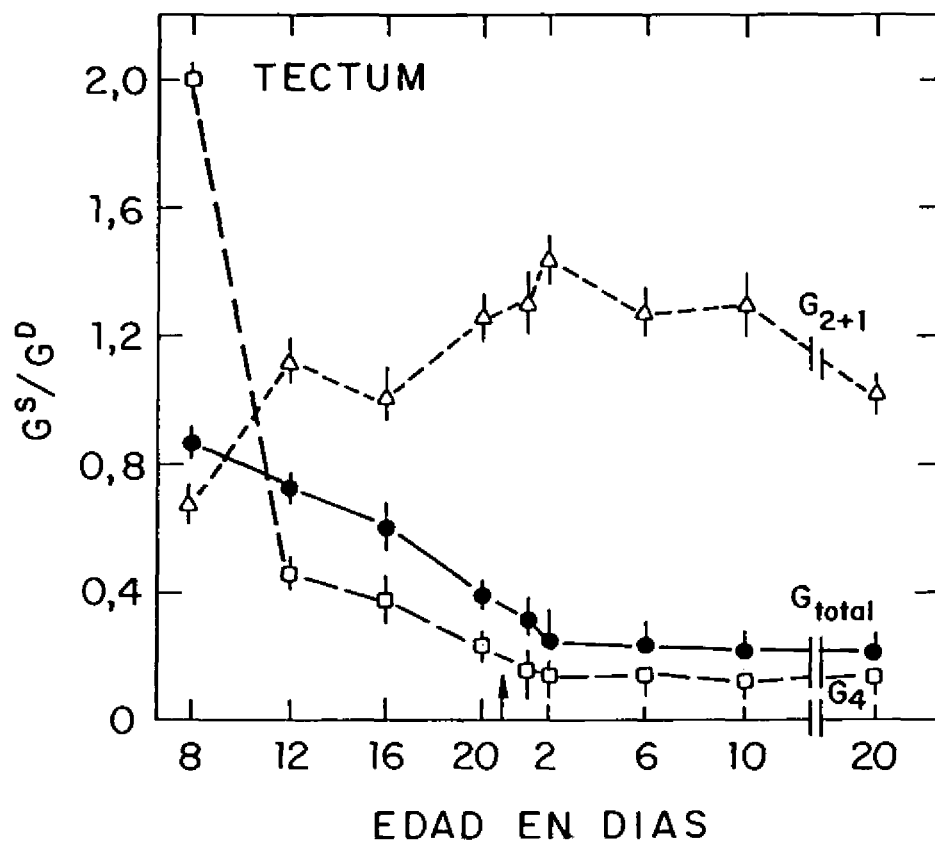


Figura 39.- Relación a lo largo del desarrollo entre las formas G^s/G^0 en el tectum del pollo. Los resultados representan el cociente de los puntos de las Fig. 36 y 37.

● = G_{total}^s/G_{total}^0 ; □ = G_4^s/G_4^0 y △ = G_{2+1}^s/G_{2+1}^0 .

4.3.4. Análisis de formas moleculares de AChE durante el desarrollo del músculo esquelético.

La ausencia de formas A de la clase I en la retina y el tectum del pollo no nos ha permitido estudiar la variación de la proporción relativa de las dos clases de formas asimétricas durante el desarrollo. Para poder dar alguna evidencia sobre este punto que pueda aclarar la razón de ser de dichas formas asimétricas hemos recurrido al análisis de las formas moleculares de AChE, con especial mención de las formas asimétricas, en el músculo esquelético del pollo en desarrollo.

Para este tipo de experimentos se utilizan pollos desde el 8º día del desarrollo embrionario al 10º del desarrollo postnatal. Para este análisis se utilizaban los músculos de la parte inferior de la pata de al menos dos animales. La extracción se hizo de forma secuencial como se describe en el apartado 4.2.6.1. con soluciones que contenían Iria, sal, Tritón para las primeras 4 extracciones y Iria, sal, Tritón, colato y EDTA para la 5ª a 8ª.

En la Fig. 40 se resume la distribución de actividad acetilcolinesterásica asimétrica entre las dos clases de formas descritas. En la gráfica se representan los porcentajes de cada una de las formas (A^I o A^{II}) dividido entre la suma de las dos, y expresado como porcentaje frente a las edades embrionarias y postnatales que se indican. Se observa en la gráfica que tras el nacimiento, las formas asimétricas clase II se encuentran en una proporción más elevada.

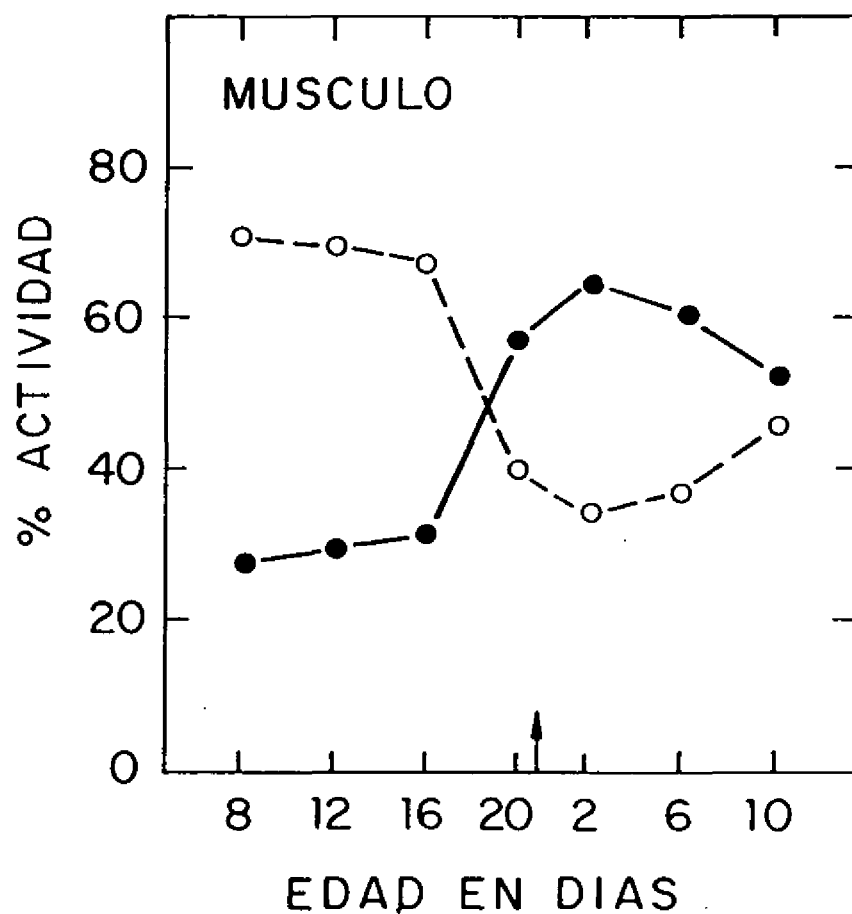


Figura 40.- Porcentaje de la actividad enzimática de cada una de las clases de formas asimétricas (I y II) con respecto a la actividad total de formas A (I+II), a lo largo del desarrollo del músculo esquelético de pollo. Los puntos indican la media de 3 determinaciones. La desviación estándar en todos los casos era menor del 5% . ○ = $I \times 100 / I + II$; ● = $II \times 100 / I + II$.

Ya desde el primer punto embrionario se encuentran los dos tipos de formas A. Las Figs. 41 y 42 muestran los perfiles de sedimentación de todas las formas moleculares de AChE en músculo esquelético en las edades embrionarias y postnatales estudiadas. Se puede ver que las formas globulares se extraen, en su práctica totalidad, por medio de la solución primaria que contiene Tris, sal y Tritón. En estos primeros extractos se obtienen las formas A de la clase I que están constituidos principalmente por la forma más compleja (A^{12}_{12}) y en menor proporción de forma A^{12}_6 (dos tetrámeros y la cola) que aparece a partir del 6º día postnatal.

En el caso de los extractos con EDTA, se observa el bajo porcentaje de formas globulares (ya que se extraen en las homogeneizaciones previas con sal y detergente). Las formas asimétricas están constituidas principalmente por A^{11}_{12} y una menor cantidad de A^{11}_6 .

Hemos visto que en pollos de 10 días la relación entre formas A^1/A^{11} es de 0,075 en la retina y 0,08 en el tectum como se muestra en la tabla VIII.

La Fig. 43 resume los porcentajes de actividad de las distintas formas moleculares de la AChE durante el desarrollo del músculo esquelético del pollo. Las actividades que se muestran son la suma de todas las extracciones. Se puede ver que el porcentaje de formas asimétricas aumenta durante las etapas del desarrollo estudiado, hasta llegar a un valor máximo en el día 69 postnatal y disminuyendo en el día 102. Se observa que las formas A^1 aumentan de forma prácticamente constante. En las formas A^{11} el aumento más drástico ocurre en los puntos más próximos a la eclosión. El porcentaje de las

formas globulares sufre el efecto contrario al de las asimétricas, disminuyendo bruscamente durante los días más próximos al nacimiento.

Se puede observar en esta figura que en el desarrollo del músculo se da un gran aumento de formas A en los días anteriores a la eclosión hasta llegar a una "meseta" tras el nacimiento. Este aumento de formas A en la época perinatal ocurre debido principalmente a las formas de la clase II.

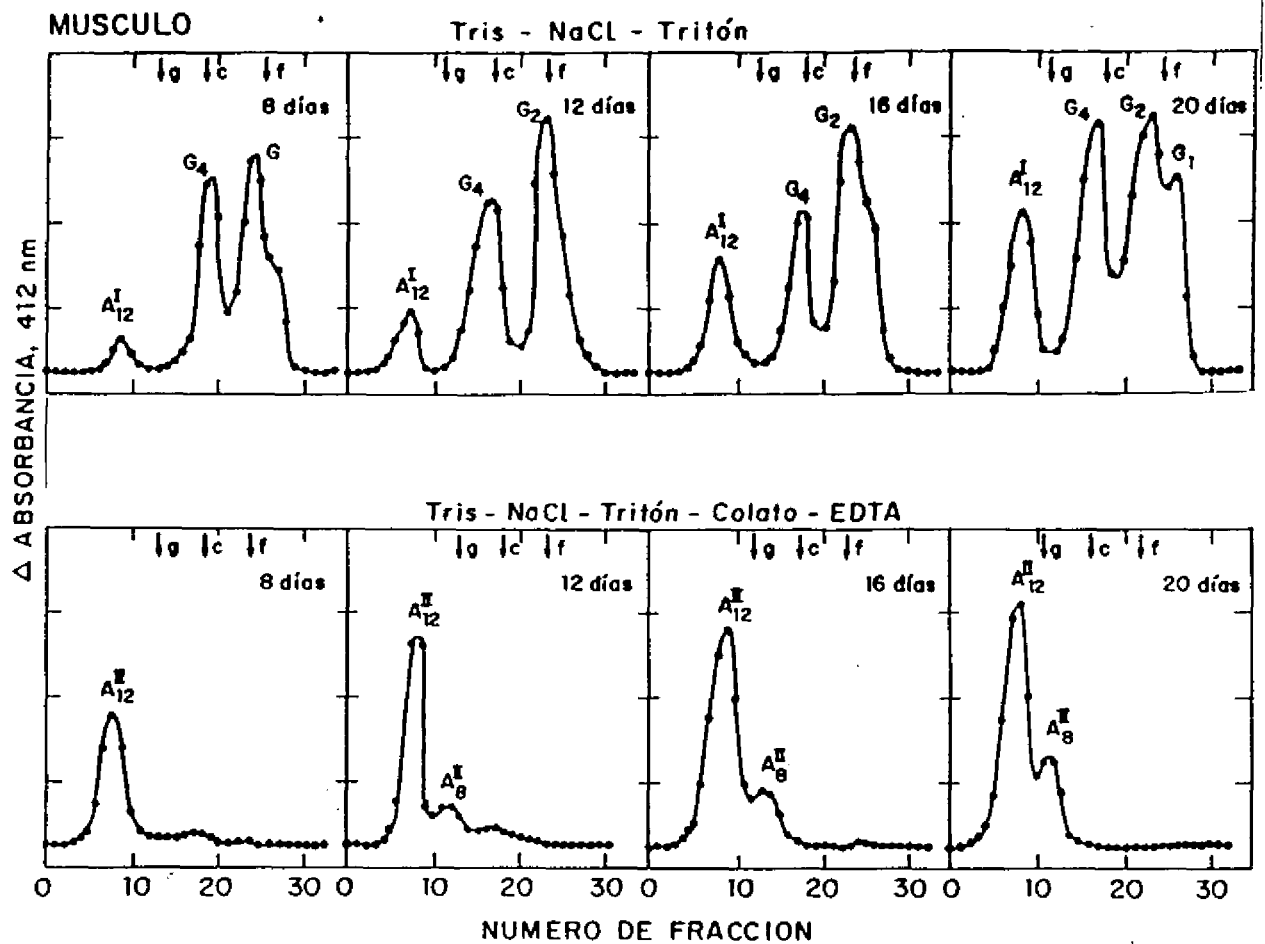


Figure 11.- Perfiles de sedimentación de las fracciones moleculares de ACNE de músculo esquelético de pollo, extraídas de forma secuencial. El músculo de la parte inferior de la pata de embriones de pollo, de las edades que se indican, se extrajo 4 veces en la solución que se cita (paneles superiores) y la mezcla de los 4 sobrenadantes se corrió sobre un gradiente de sacarosa del 5 al 20% preparado en la solución de homogeneización. El sedimento de la 4ª sedimentación y de las 3 siguientes se extrajo en una solución como la anterior pero con colato sódico y EDTA (paneles inferiores). Se juntaron los sobrenadantes y se corrieron sobre un gradiente con colato y EDTA. Otros detalles en la Fig. 20.

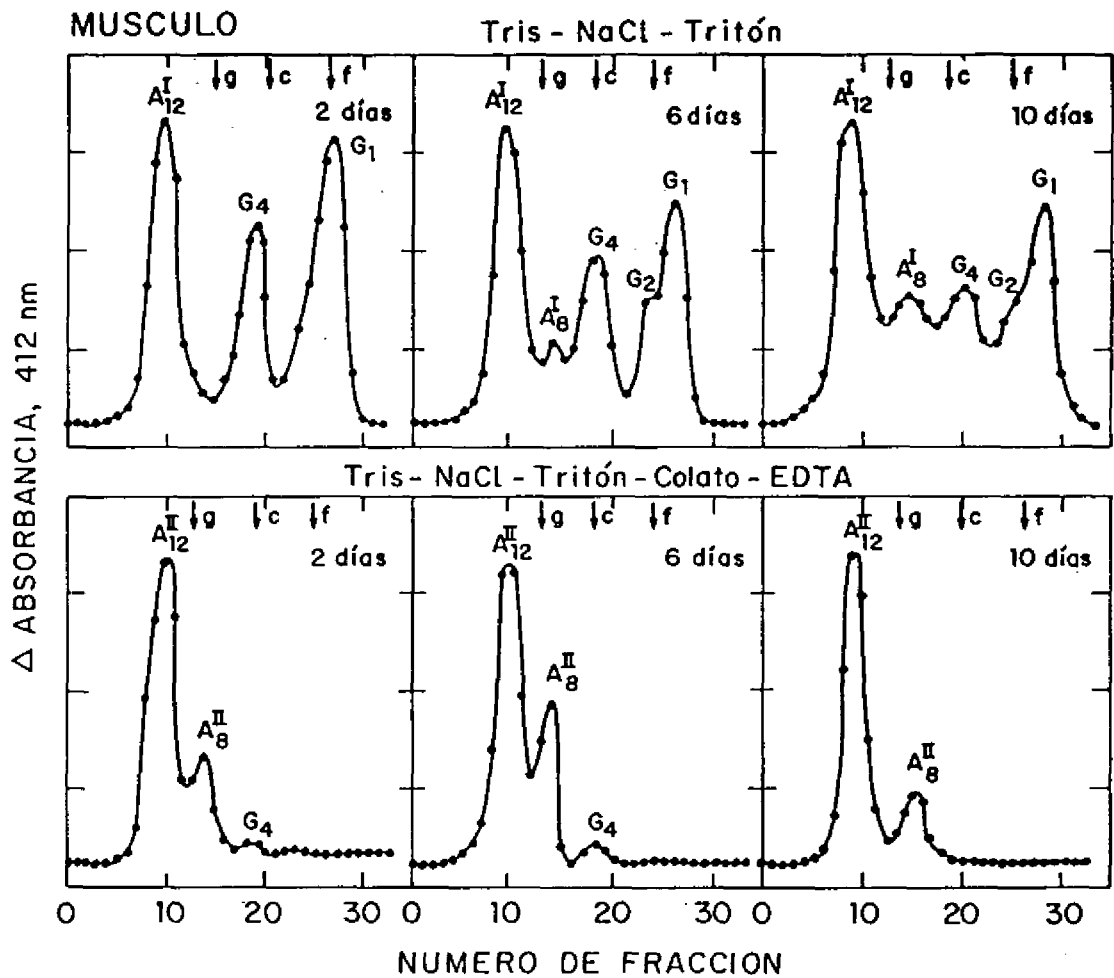


Figura 42.- Perfilas de sedimentación de las formas moleculares de AChE de músculo esquelético de pollo. El tejido de pollos jóvenes se extrajo de forma secuencial en las dos soluciones que se indican en la figura; en los paneles superiores sin EDTA, en los paneles inferiores con EDTA. Observe detalles en la Fig. 41.

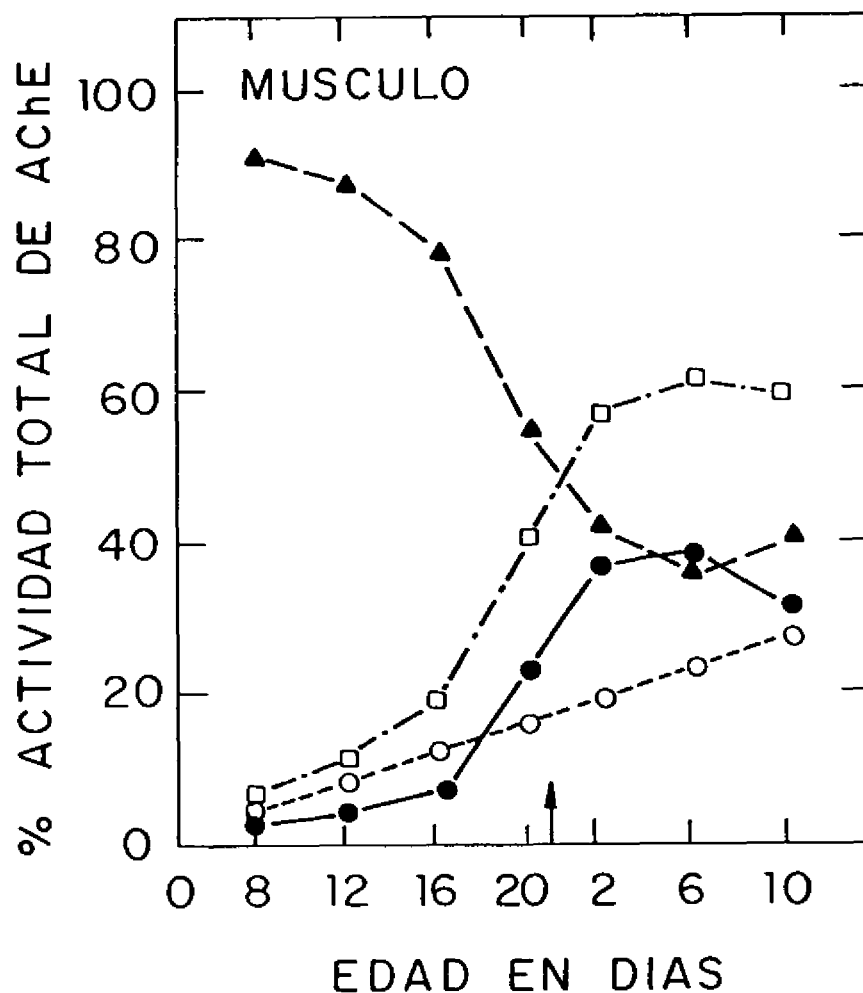


Figura 48.- Porcentaje de la actividad total de AChE en el homogenado inicial distribuido entre las distintas formas moleculares, en el músculo esquelético del pollo. Los puntos representan la media de 3 determinaciones independientes. La desviación estándar (no incluida debido a la multiplicidad de curvas) era en todos los casos inferior al 10%. Los valores se indican: ▲ = formas G totales; ◻ = formas A totales; ○ = A¹ y ● = A².

4.4. DESARROLLO DE LAS FORMAS MOLECULARES DE AChE EN CULTIVOS DE RETINA Y TECTUM.

Para ver la distribución entre las distintas formas estructurales de la AChE en la retina y el tectum "in vitro" se preparan cultivos de agregación de células disociadas de estos tejidos. En apartados anteriores se mostraba que estos cultivos expresan la actividad de los enzimas colinérgicos: ChAT y AChE. Entonces una vez que teníamos los porcentajes, y actividades, de distribución de las distintas formas moleculares de AChE "in vivo" (apartado 4.3), pasamos a realizar su estudio de forma paralela en cultivo.

La solución de extracción que se utilizó fué la misma, ya que era la que obtenía unos mejores rendimientos en la extracción de todas las formas moleculares de AChE y además proporcionaba los resultados más reproducibles.

En la Fig. 44 se muestran los porcentajes frente a la actividad AChE total en el homogenado, de las formas moleculares. Se puede observar la presencia de forma A₁₂ que alcanza un máximo en el día 8 en cultivo tanto en retina como en tectum con valores que no superan el 3% de la actividad AChE total. También se puede observar que durante el desarrollo en cultivo se produce un crecimiento, más o menos constante, de formas G₄ al avanzar en el periodo de tiempo en cultivo estudiado, este aumento de formas G₄ se compensa, lógicamente, con la reducción en el porcentaje relativo de las formas de baja velocidad de sedimentación G₂ y G₁.

En la Fig. 45 se representa la actividad específica de

las distintas formas. En estos perfiles se puede observar un aumento casi constante de la actividad específica de G₄ a lo largo del periodo de desarrollo estudiado que se da en la retina y en el tectum, este aumento se produce hasta el día 22 en cultivo. Tanto en la forma A₁₂, como en los perfiles de G₄₁, no se da este aumento sino que el perfil es más variable. En los dos casos se observa un cierto paralelismo en la retina y el tectum.

De forma análoga en la Fig. 46 se muestran los valores de actividad total de las formas moleculares de AChE en cultivos de retina y tectum.

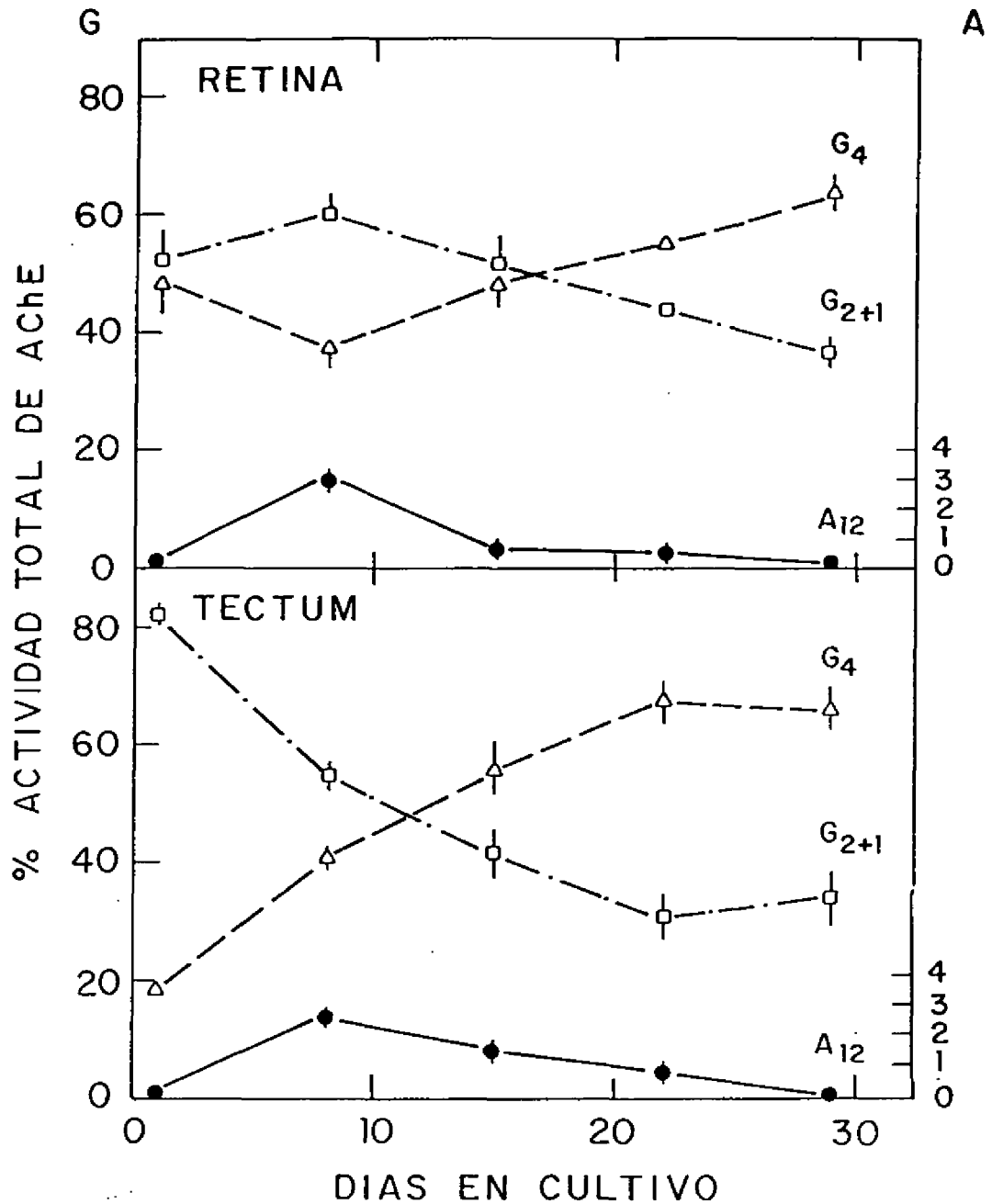


Figura 94.- Perfiles de los porcentajes de actividad de las formas moleculares de AChE durante el desarrollo en cultivos. Los % se calculan frente al valor de la actividad AChE total en la retina (panel superior) y en el tectum (panel inferior). La extracción se realizó con un medio que contenía: Tris 10mM, NaCl 1M, EDTA 2mM y colestol al 1%. La mezcla de dos sobrenadantes (correspondientes a 2 extracciones sucesivas) se colocó sobre un gradiente de sacarosa. Los porcentajes se calcularon por el método radiométrico. Los valores representan la media de \pm D.E. de al menos 3 experimentos. Tanto en retina como en tectum: \bullet = %A₁₂; Δ = %G₄ y \square = %G₂₊₁.

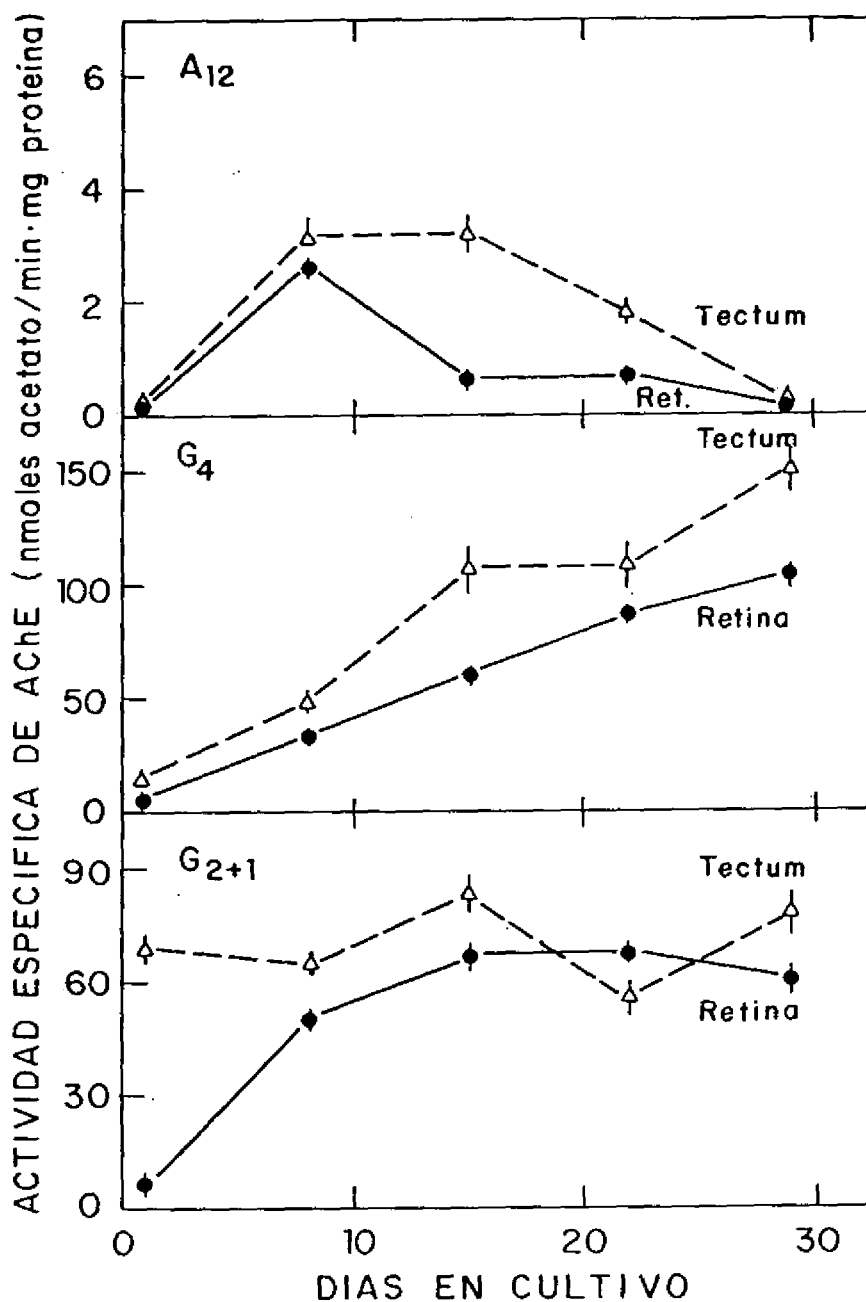


Figura 45.- Actividad específica de las formas moleculares de AChE durante el desarrollo en cultivos de agregados celulares. En el panel superior se representa la forma A₁₂, en el panel medio G₄ y en el panel inferior G₂₊₁. En los tres casos ● actividad específica en la retina Δ actividad específica en el tectum.

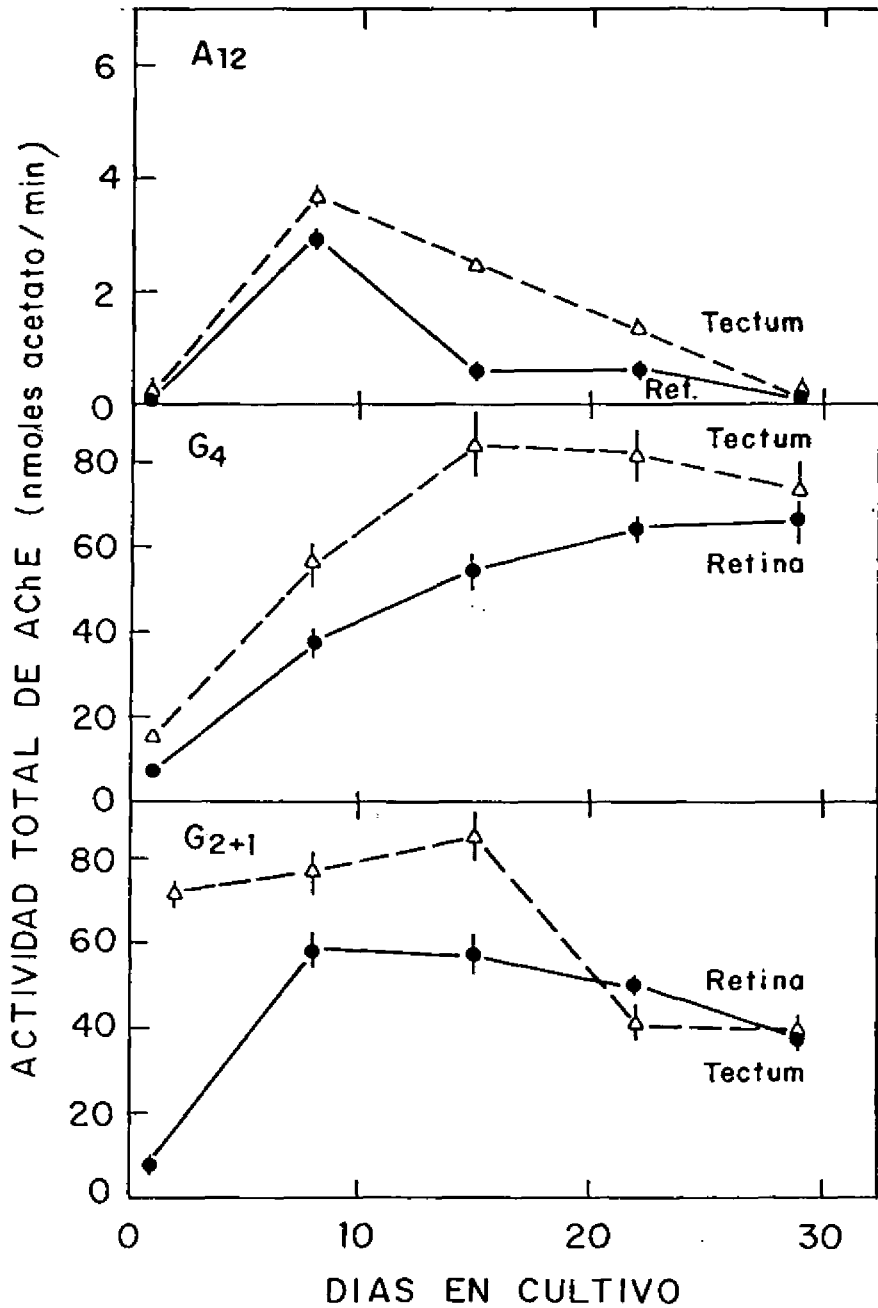


Figura 95.- Perfiles de la actividad AChE total en las distintas formas moleculares durante el desarrollo en cultivo. En el panel superior se dan los resultados obtenidos en la forma A12, en el panel medio de G4, y en el panel inferior de G2+1. Los valores se expresaron en nmoles acetato formado/min. ● actividad específica en la retina. ▲ actividad específica en el tectum óptico en cultivo.

4.5. REGULACION DEL DESARROLLO DE AChE POR INTERACCIONES CELULARES EMBRIONARIAS Y VARIACIONES DE LA FUNCION VISUAL POSTNATAL.

Las variaciones observadas en los parámetros colinérgicos durante, los primeros días del desarrollo postnatal, coincidentes con la apertura de los ojos por el pollo, nos hizo pensar que alteraciones tempranas de los niveles de la señal visual en la retina, así como la adición de drogas relacionadas con los neurotransmisores retíneales, podrían modular y afectar la actividad de las sinapsis colinérgicas y/o especialmente de la AChE en el tectum de pollos que habían sufrido alguna manipulación embrionaria.

Con objeto de comprobar estos efectos sometimos a los animales a privación visual y enucleación temprana de un ojo y probamos también los efectos de adición de sustancias "in ovo". Estos resultados los comparamos con coagregados de células de retina y tectum en cultivo.

4.5.1. Regulación del desarrollo de la AChE por interacciones celulares.

4.5.1.1. Efecto "in vivo" de la enucleación visual temprana sobre el desarrollo de la AChE en el tectum óptico.

Estos estudios nos permiten observar el efecto de la interacción y conexión retinotectal sobre los enzimas colinérgicos.

Desde hace tiempo se conoce que el tectum tiene un

periodo de desarrollo autónomo (hasta el día 129 y 139 embrionario) y otro periodo dependiente de la llegada del nervio óptico. La supresión de esta interacción, está descrito que altera algunas poblaciones de neurotransmisores (ya que el enuclear supone extirpar la vesícula óptica en un estadio muy temprano del desarrollo embrionario, de manera que se elimina la conexión entre retina y tectum).

Nuestro objetivo era estudiar el efecto de la enucleación sobre el desarrollo de la AChE en el tectum contralateral al ojo enucleado en relación al tectum ipsilateral que nos sirve como control.

En la Fig. 47 se muestran los perfiles de desarrollo de la AChE, de pollos que han sufrido enucleación del ojo derecho, a las 40 a 48 horas de puestos en el incubador. Se observa en el tectum desaferentado (T_1), una reducción tanto en la cantidad de proteína (panel central), como en la actividad AChE (panel inferior), en relación al tectum control (T_0). La disminución de estos dos parámetros parece estar compensada, como se ve en el panel superior.

Las actividades específicas en el tectum derecho y el tectum izquierdo son prácticamente indistinguibles. Esto se encuentra resumido en la Fig. 48 en la que vemos que en la relación entre tectum desaferentado y control la actividad específica se mantiene próxima a 1, observándose un cambio más marcado en los días próximos al nacimiento, mientras que las otras dos curvas (proteína y actividad total) se alejan de 1 hacia valores inferiores.

Nos interesaba conocer la distribución de formas moleculares de la AChE para ver si la enucleación, que hemos

visto que afecta a la actividad total de la AChE en el tectum desaferentado actúa sobre la proporción de alguna forma molecular de AChE, en concreto. Los perfiles de la Fig. 49 que se resumen en la Fig. 50, indican que esta diferencia no se produce y que en el tectum desaferentado se produce un "equilibrio" entre las formas moleculares de la AChE que hace que mantengan su proporción y no se muestran diferencias muy marcadas en relación al tectum control.

En todas estas figuras (47 a 50) se representan también los valores obtenidos en pollos normales (no operados), pertenecientes al mismo lote.

Por último parecía interesante comparar los perfiles de la actividad AChE con otro parámetro que es la ChAT, que nos sirve de marcador de sinapsis colinérgicas. Para ello utilizamos los mismos animales que usábamos para medir la AChE. Del homogenado inicial de tejido se tomaba una muestra para medir la actividad ChAT por un procedimiento radiométrico semejante al de la AChE. En la Fig. 51 se muestran los perfiles de actividad del enzima de síntesis de la acetilcolina (ChAT). Se puede ver que paralelamente a lo que ocurre con la actividad AChE se observó en este caso también una disminución de la actividad total del tectum desaferentado respecto al tectum control, que no se acompaña de la relación de proteína total del tejido (Fig. 51 panel superior y Fig. 52).

Hay que hacer notar que la disminución irreversible de la cantidad de proteína que se produce en el tectum desaferentado era patente por simple observación de los lóbulos tectales.

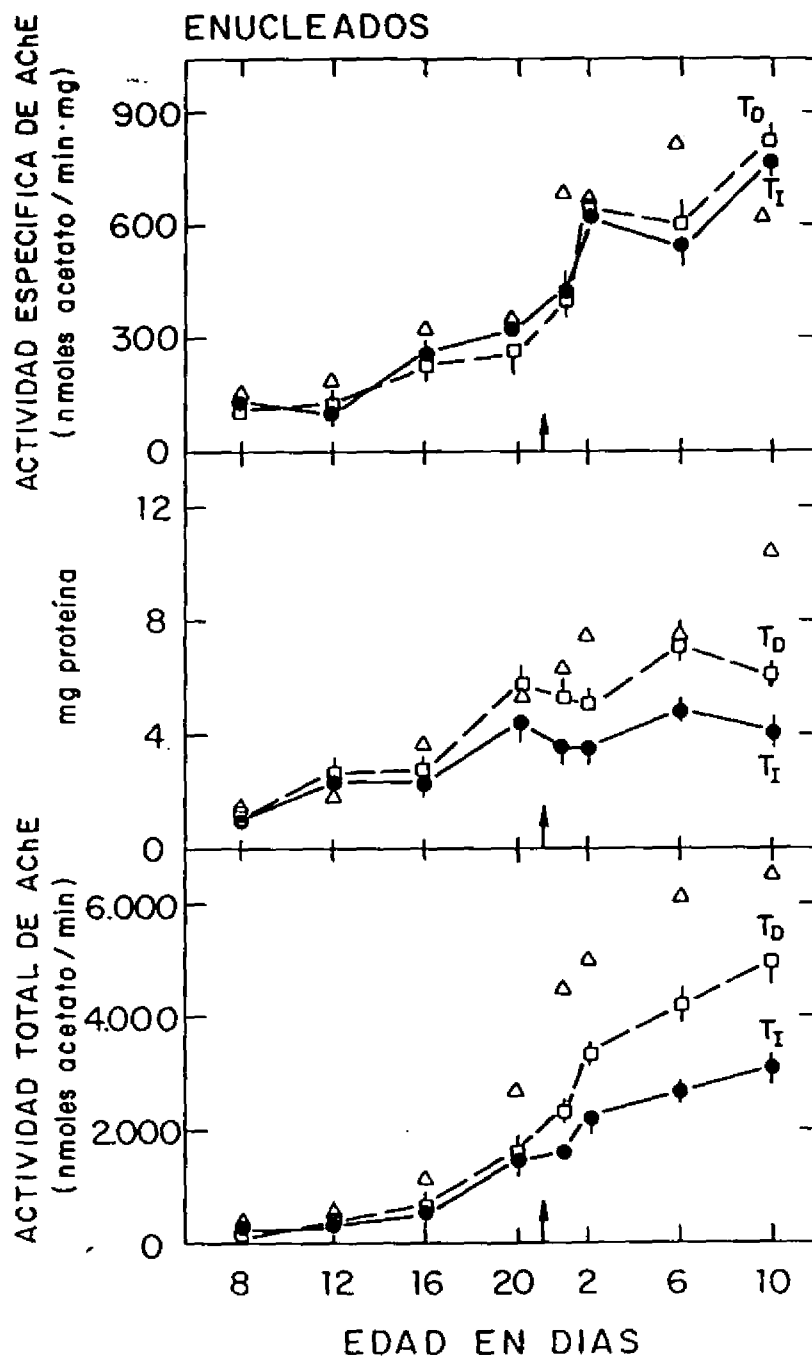


Figura 42.- Perfiles de desarrollo de la actividad AChE de pollos en los que ha sido extirpada la vesícula óptica derecha, a las 40-48 h. de puestos en el incubador. En el panel superior se representa la actividad específica en nmoles de acetato formado/min. mg de proteína. El panel medio representa la cantidad de proteína del tejido y el panel inferior la actividad total en nmoles de acetato formado/min. En los tres casos: ● = tectum izquierdo (desafectado); ◻ = tectum derecho (control); Δ = pollos normales. Los valores se refieren a un lóbulo tectal y representan la media ± D.E. de al menos 8 experimentos.

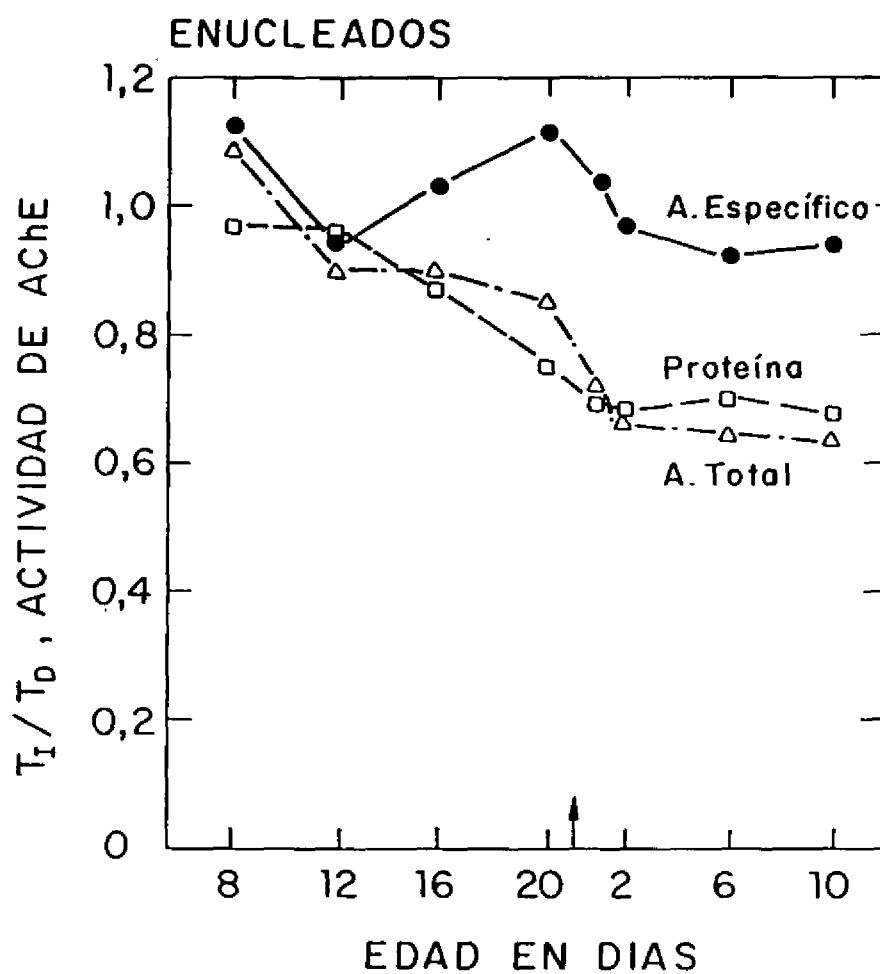


Figura 48.- Relación a lo largo del desarrollo entre los parámetros de la Fig. 47 del tectum izquierdo (desnervado) y el tectum derecho (control). ● cociente de la actividad específica; □ cociente de la cantidad de proteína y △ cociente de la actividad total de los dos tectos.

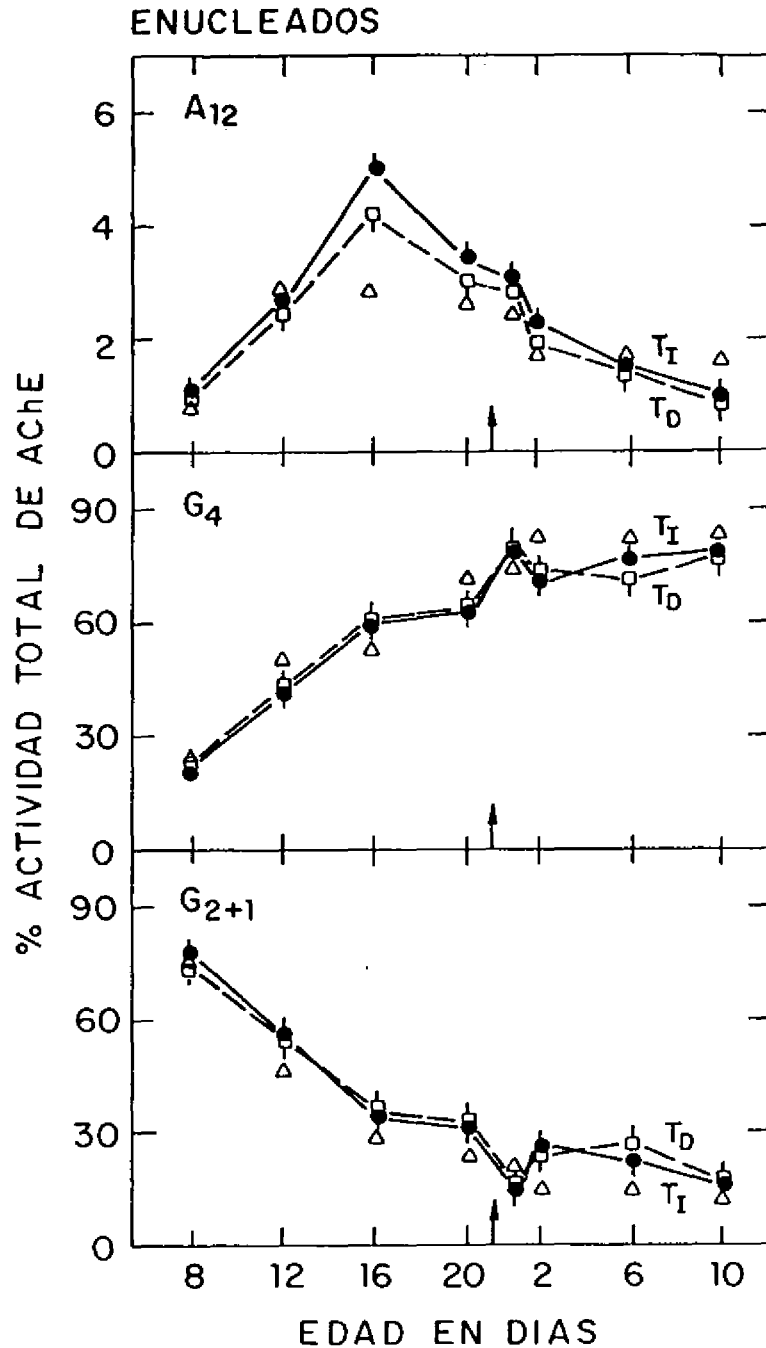


Figura 49.- Perfiles de desarrollo de los porcentajes de las formas moleculares de AChE, en pollos a los que se les ha extirpado la vesícula óptica derecha, entre las 40 y 48 horas de puestos en el incubador. En el panel superior se representa la forma A₁₂, en el panel medio G₄ y en el panel inferior las formas G₂₊₁. En los tres casos: ● = % de la forma considerada en el tectum izquierdo (desaferentado); ◻ = % de la forma en el tectum derecho (control); Δ = un lóbulo tectal en pollos normales como los de la Fig. 34 y 35. Los valores se obtuvieron por el procedimiento radiométrico en función de la actividad AChE total y son la media ± D.E. de 3 o más experimentos.

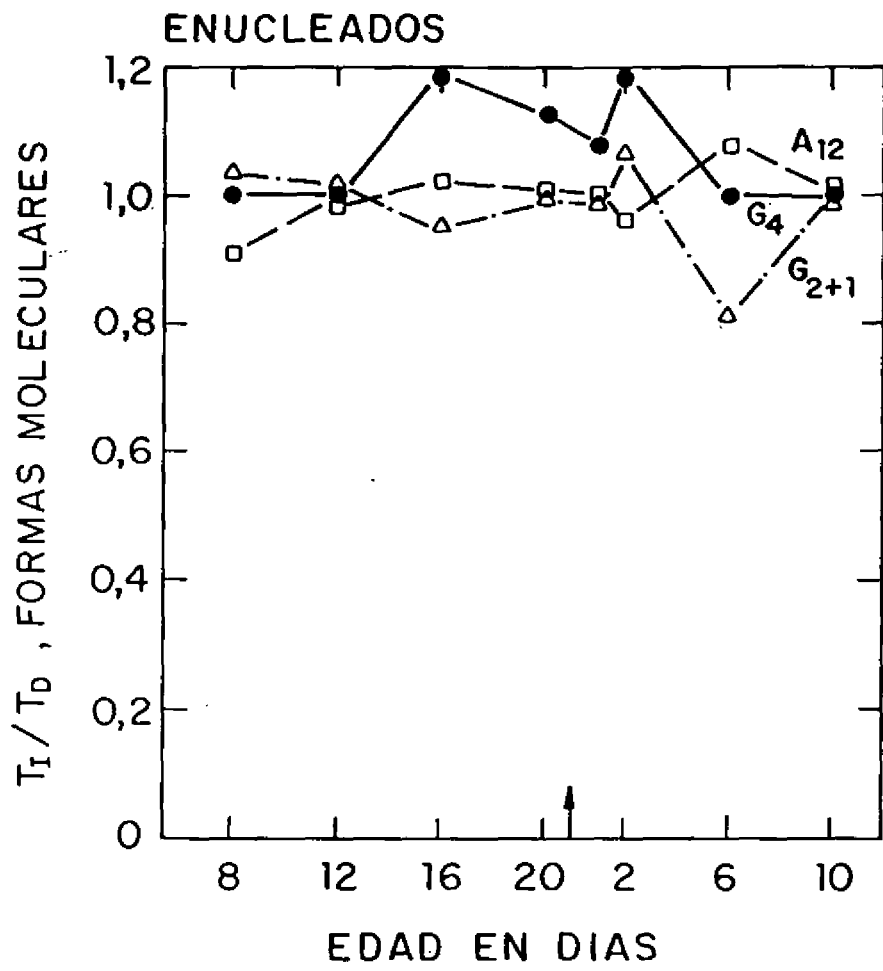


Figura 59.- Relación a lo largo del desarrollo de los porcentajes de formas moleculares de AChE que se muestra en la Fig. 49. El valor del tectum desafrentado se refiere al correspondiente del tectum control. \bullet cociente de los porcentajes de A12; \square cociente de formas G4; Δ cociente de formas G2+1.

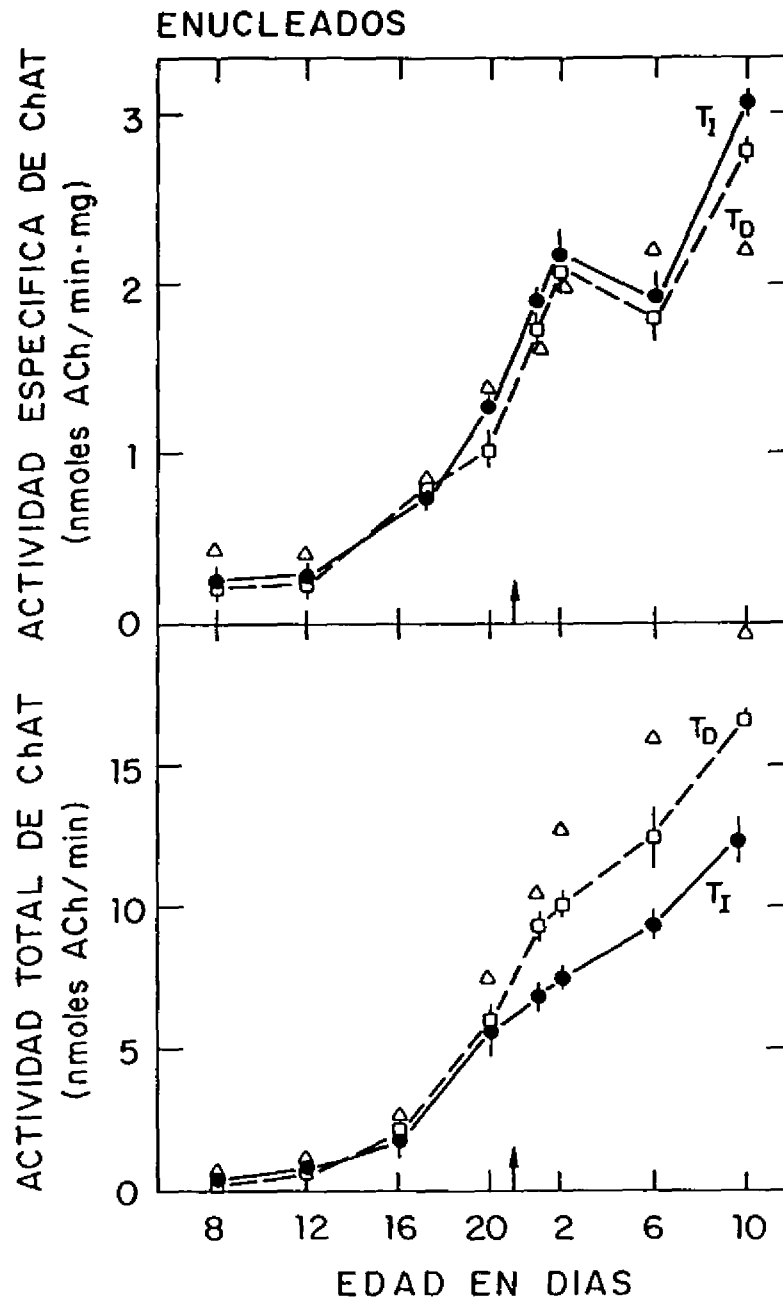


Figura 51.- Perfiles de desarrollo de la actividad ChAT en pollos a los que se les ha extirpado la vesícula derecha a las 40-48 horas de comenzar el desarrollo embrionario en el incubador. El panel superior, representa la actividad específica del enzima en el nmoles de acetilcolina formados/min.mg de proteínas. El panel inferior, muestra la actividad total del enzima en el tejido en nmoles de acetilcolina formados/min. La cantidad de proteína que se ha tomado para el cálculo de la actividad específica se muestra en la Fig. 47. Δ actividad ChAT en el tectus izquierdo (desafebrizado); \bullet actividad ChAT en el tectus derecho (control); \square actividad ChAT en pollos normales. Los valores representan la media de al menos 3 experimentos.

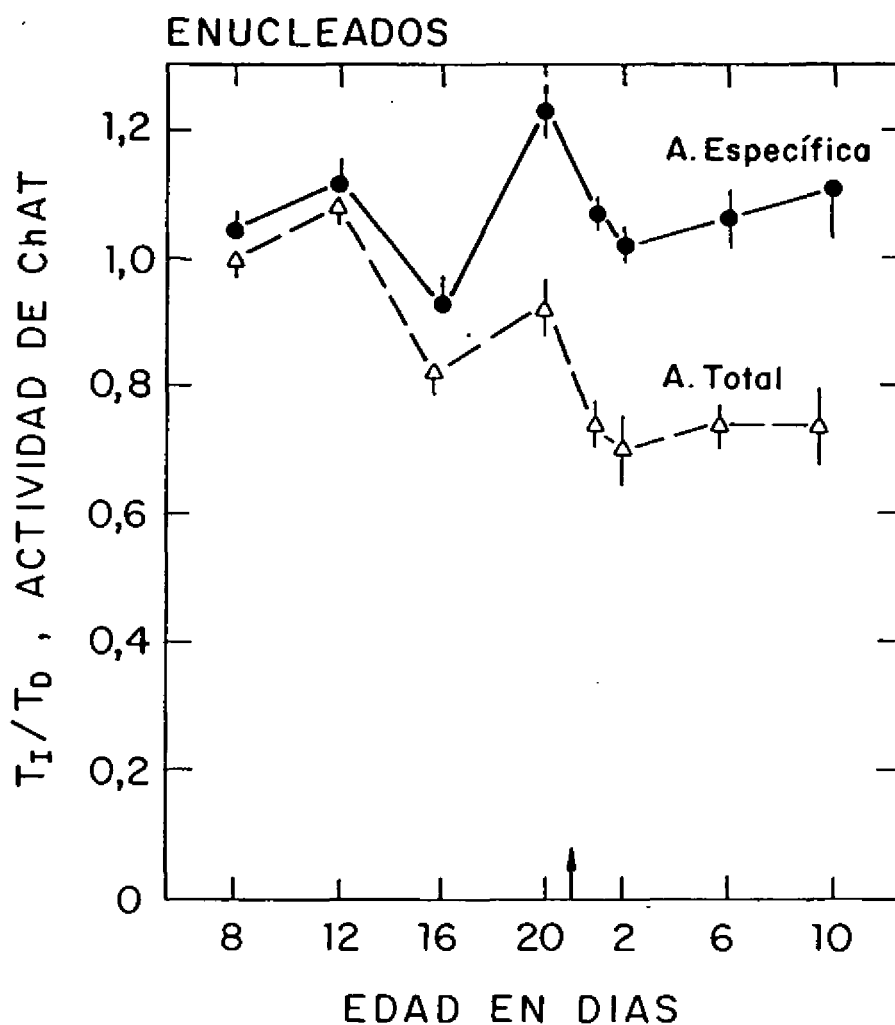


Figura 52.- Relación a lo largo del desarrollo de la actividad ChAT del tectum desafrentado frente al tectum control. Los resultados que se muestran representan el cociente de los de la Fig. 51. ● = cociente entre las actividades específicas de T_I/T_0 ; △ = cociente entre la actividad total de T_I/T_0 .

4.5.1.2. Interacción de las células de la retina y el tectum en cultivos de coagregados.

Tras analizar la actividad de los enzimas colinérgicos, durante el desarrollo en agregados de células de retina y tectum cultivados aisladamente, pasamos a estudiar estos mismos parámetros pero en cultivos de coagregados, es decir, en cultivos integrados por células de retina y tectum mezcladas en una cierta proporción. Se trataba de ver si es posible estudiar en cultivo el control del desarrollo colinérgico por la inervación retinotectal y por otra parte ver si esta interacción afectaba de alguna forma a los enzimas colinérgicos.

Para ello los valores medidos en los coagregados retina-ectum se comparan con los resultados que cabría esperar de la proporción de células de cada tejido que componen el coagregado, teniendo en cuenta los valores obtenidos con los agregados de células de retina o tectum por separado.

Hablanos de interacción específica, desde el punto de vista colinérgico, y en nuestro sistema "in vitro" cuando la actividad enzimática medida en el coagregado supere a la que podría esperarse teniendo en cuenta la composición del coagregado (porcentaje de proteína aportada por la retina y el tectum; que se deduce de la proporción inicial en que se mezclan ambos tipos celulares al preparar el coagregado). Dicho caso implica un sinergismo en que la actividad del sistema es superior a la suma de las actividades de los

Este estudio se inició con la obtención de los valores de porcentajes de proteína y DNA (Fig. 53).

Los valores obtenidos en los coagregados se comparan con los valores de DNA y proteína que se muestran en la Fig. 14, y que se correspondan con cultivos de células de retina y tectum preparados con el mismo lote de embriones y cultivados simultáneamente.

Los resultados de la Fig. 53 muestran claramente una mejor preservación tanto de DNA como de proteína en los coagregados, frente a los agregados simples. Por otra parte, los valores de DNA y proteína en los coagregados superan bastante a los que se esperaría en función de la contribución de las células de retina y tectum por separado, a lo largo del periodo de tiempo estudiado y que se muestran en la Fig. 54. La relación medido/esperado, tanto para DNA como para enzima, es algo superior a 1 en coagregados preparados con un 60% de proteína de retina y 40% de tectum. El valor superior a 1 indica una interacción sinérgica.

Claramente las interacciones retinotectales tienen un efecto trófico sobre la maduración del sistema.

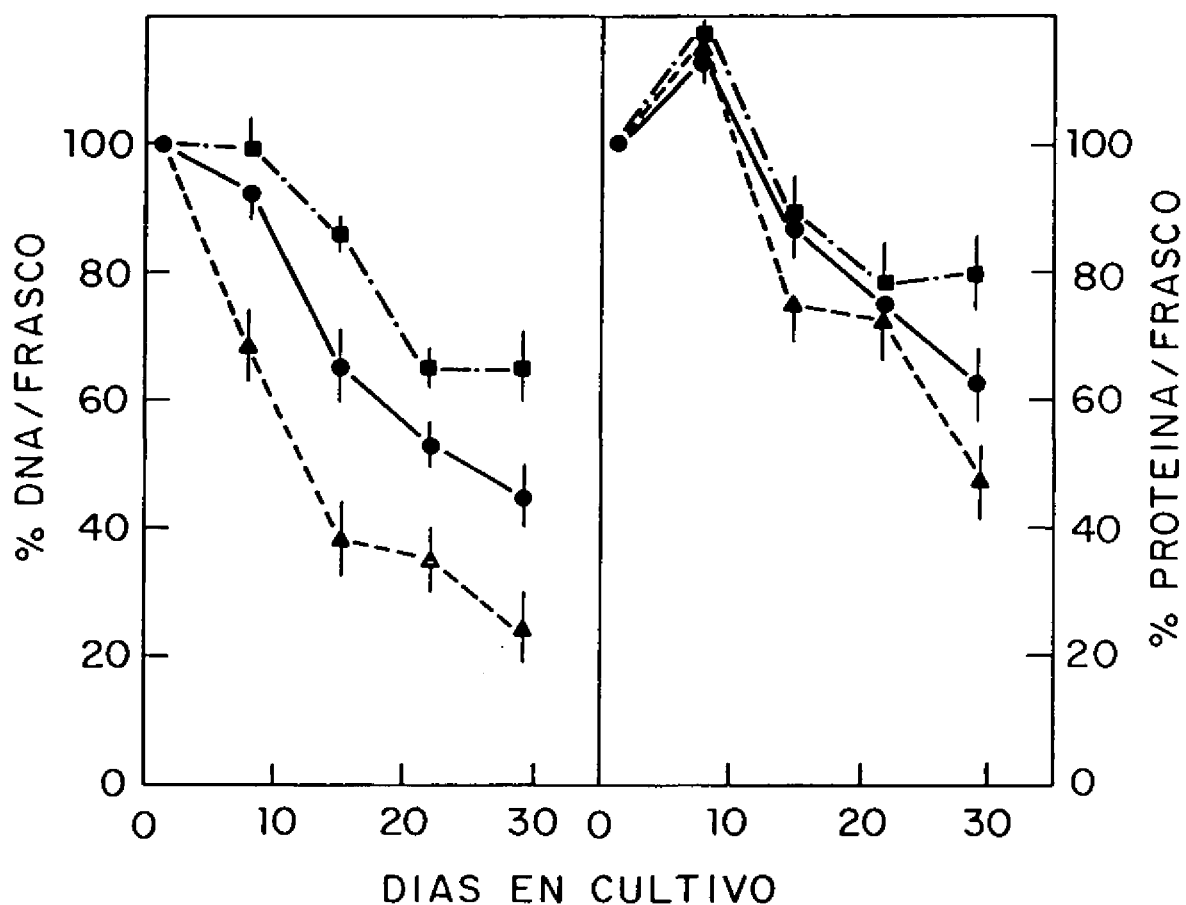


Figura 59.- Porcentaje de los cambios en la cantidad de DNA (panel de la izquierda) y proteína (panel de la derecha) en cultivos de reagregados de retina, tectum y células de retina-tectum de pollo mezclados, en función del tiempo en cultivo. Los resultados se expresan como % de los valores obtenidos tras 24 horas de cultivo. Los valores que se dan son la media de 4 experimentos y la desviación estándar. ● = agregados de células de retina, ▲ = agregados de células de tectum y ■ = coagregados de células de retina y tectum.

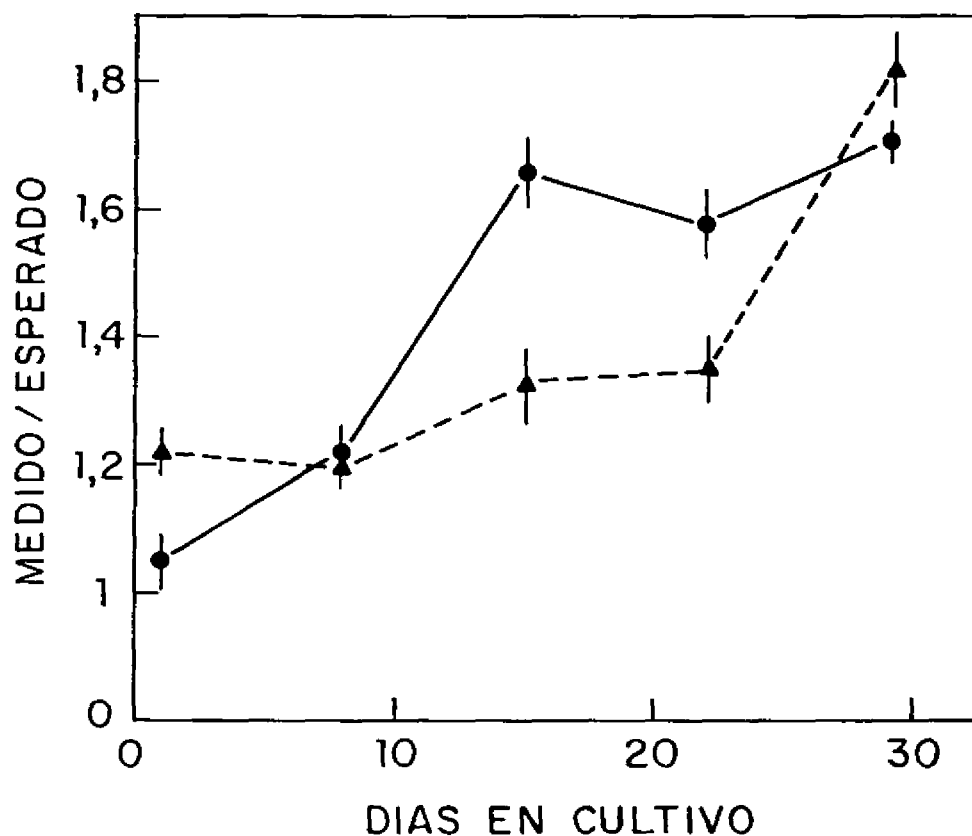


Figura 54.- Efecto de la interacción retinotectal, en cultivos de reagregados, sobre el contenido en proteína y DNA. Los coagregados se preparan con células de la retina y el tectum (60% proteína de retina/40% de tectum). La interacción se valora teniendo en cuenta lo medido y lo esperado (a partir de la contribución estimada de las células de la retina y el tectum en el coagregado). Los valores que se dan representan la media \pm desviación estándar de 6 experimentos (● = DNA; ▲ = proteína).

4.5.1.2a Actividad AChE y ChAT total en cultivos de coagregados retina-tectum.

Por último, en la Fig. 55 se muestran las actividades de los enzimas colinérgicos obtenidos en los coagregados de retina y tectum preparados de dos formas diferentes. En un caso (panel a: AChE y panel b: ChAT) con una razón en la cantidad de proteína de 86,9:13,1 de retina frente a tectum y en los dos paneles inferiores se muestra la actividad de estos dos enzimas cuando la proporción de proteína era 41,9:59,1. El panel c, representa la actividad AChE y el panel d la actividad ChAT. Estas actividades medidas en cultivos de coagregados se comparan con los valores de actividades esperadas. También se comparan con los cultivos de agregados de retina sola y tectum solo, obtenidos a partir de embriones procedentes del mismo lote y puestos en cultivo de forma simultánea con los agregados. En todos los casos los cultivos eran sincrónicos (las células de retina y tectum poseían la misma edad, 7 días de incubación).

Los resultados que se muestran tratan de probar si las interacciones celulares en coagregados de retina y tectum afectan al desarrollo de los enzimas colinérgicos. Se considera que existe interacción específica. En esta figura se observa que en los dos casos presentados la actividad de ChAT en los coagregados es notablemente mayor de la que cabría esperar por las contribuciones individuales de las células de retina y tectum que componen dicho coagregado. Para la AChE los resultados son más variables ya que en coagregados de proporción 41,9:59,1 (panel c) los valores esperados y medidos

son iguales excepto en los puntos finales de la curva en donde la interacción parece resultar "negativa".

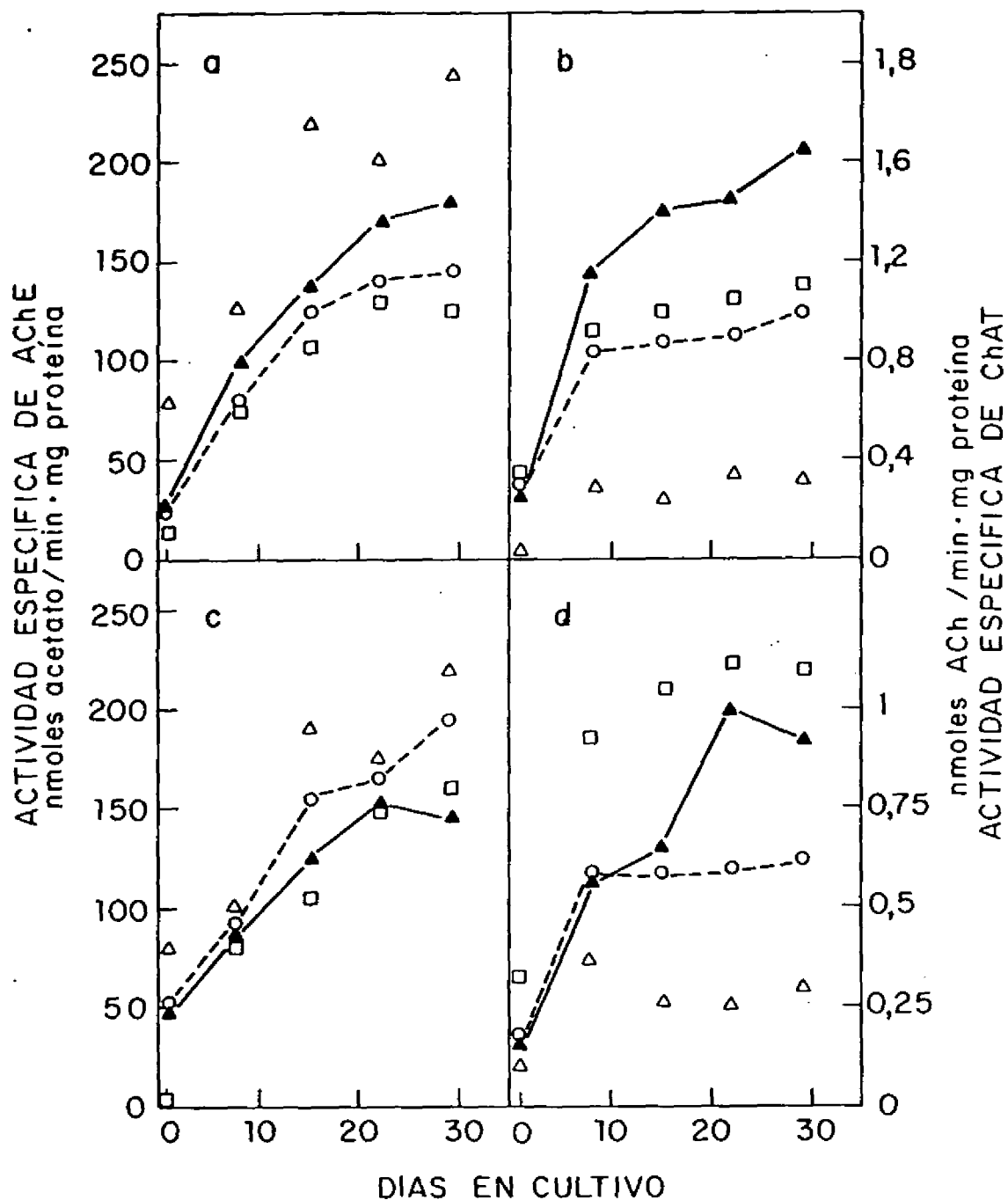


Figura 55.- Perfiles de la actividad específica de los enzimas colinérgicos: AChE (paneles a y c) y ChAT (paneles b y d) en coagregados de células de retina y tectum de embriones de pollo de 7 días. Los dos paneles superiores (a y b) representan coagregados en los que la razón de cantidad de proteína de retina frente a tectum era 36,9:13,1. En los paneles inferiores (c y d) la razón de proteína de retina y tectum era 41,9:58,1. Se ensayaron cuatro muestras independientes por cada tipo de agregado (en todos los casos las desviaciones que no se muestran en la figura eran menores del 10%). Se calculó también la "actividad esperada" para el coagregado, teniendo en cuenta la proporción mencionada de células de retina y tectum en el mismo. (□ = actividad de los agregados de retina, △ = actividad de los agregados de tectum, ○ = actividad esperada para el coagregado retina-tectum, ● = actividad medida en el coagregado retina-tectum).

4.5.1.2b Desarrollo de formas moleculares de AChE en cultivos de coagregados retina-tectum.

La distribución entre las distintas formas estructurales de la AChE obtenidas en cultivos de agregación de células disociadas de retina y tectum se comparan con las obtenidas en coagregados retina-tectum preparados simultáneamente, con una proporción de proteína 86:14 (retina:tectum).

Para el análisis se toman los agregados de al menos dos frascos de retina, tectum y del coagregado retina-tectum y se extraen dos veces en una solución que contiene Tris HCl 10mM, NaCl 1M, EDTA 2 mM y colato sódico 1%. La mezcla de los dos sobrenadantes se analizó por los procedimientos habituales. En la Fig. 56 se muestran los perfiles de sedimentación de la AChE de retina (panel superior izquierdo) tectum (panel derecho) y retina-tectum (panel inferior), de embriones de 8 días en cultivo. Se observa por análisis de las fracciones del gradiente, con el método de Ellman, la aparición de tres picos. La actividad mayoritaria se encontraba en el pico de menor velocidad de sedimentación (formas $G_{2,1}$). También se observaba un pequeño pico de forma A_{12} cuya naturaleza asimétrica se comprobó por acción de la colagenasa y agregación con Ca^{2+} .

Un análisis cuantitativo más preciso realizado por el método radiométrico de los picos del gradiente, se muestra en la Fig. 57 en la que se representan los porcentajes de AChE en cada una de las formas en el coagregado en función de los días en cultivo y se compara con los de los cultivos de retina y tectum por separado que se mostraba en la Fig. 44. Se puede

observar que en cultivo se produce un aumento de proporción de A_{12} entre los dos primeros días de desarrollo para luego ir decreciendo hasta valores casi inapreciables. Las formas G_{2+1} siguen un patrón algo similar pero con un decrecimiento menor, mientras que la forma G_4 asciende de forma más o menos constante. No se observan diferencias muy marcadas entre los perfiles de los agregados individuales y de los coagregados.

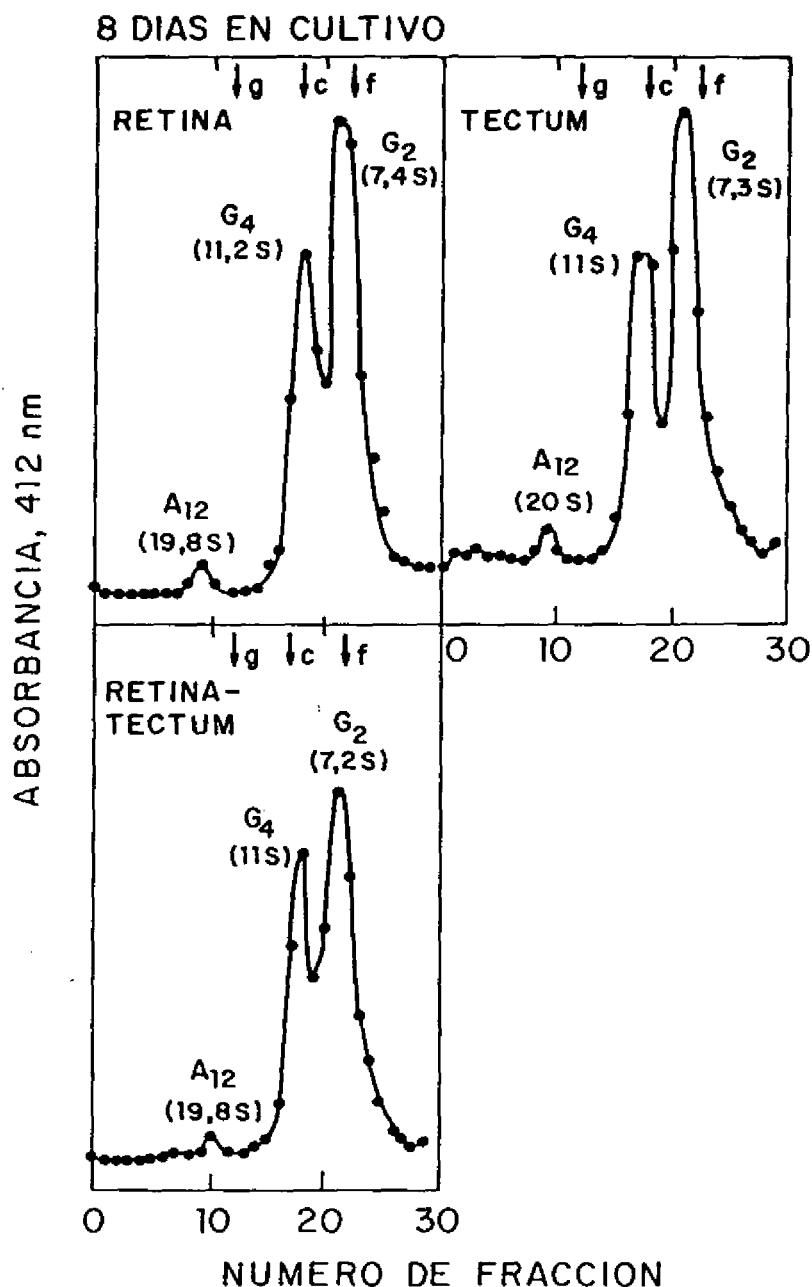
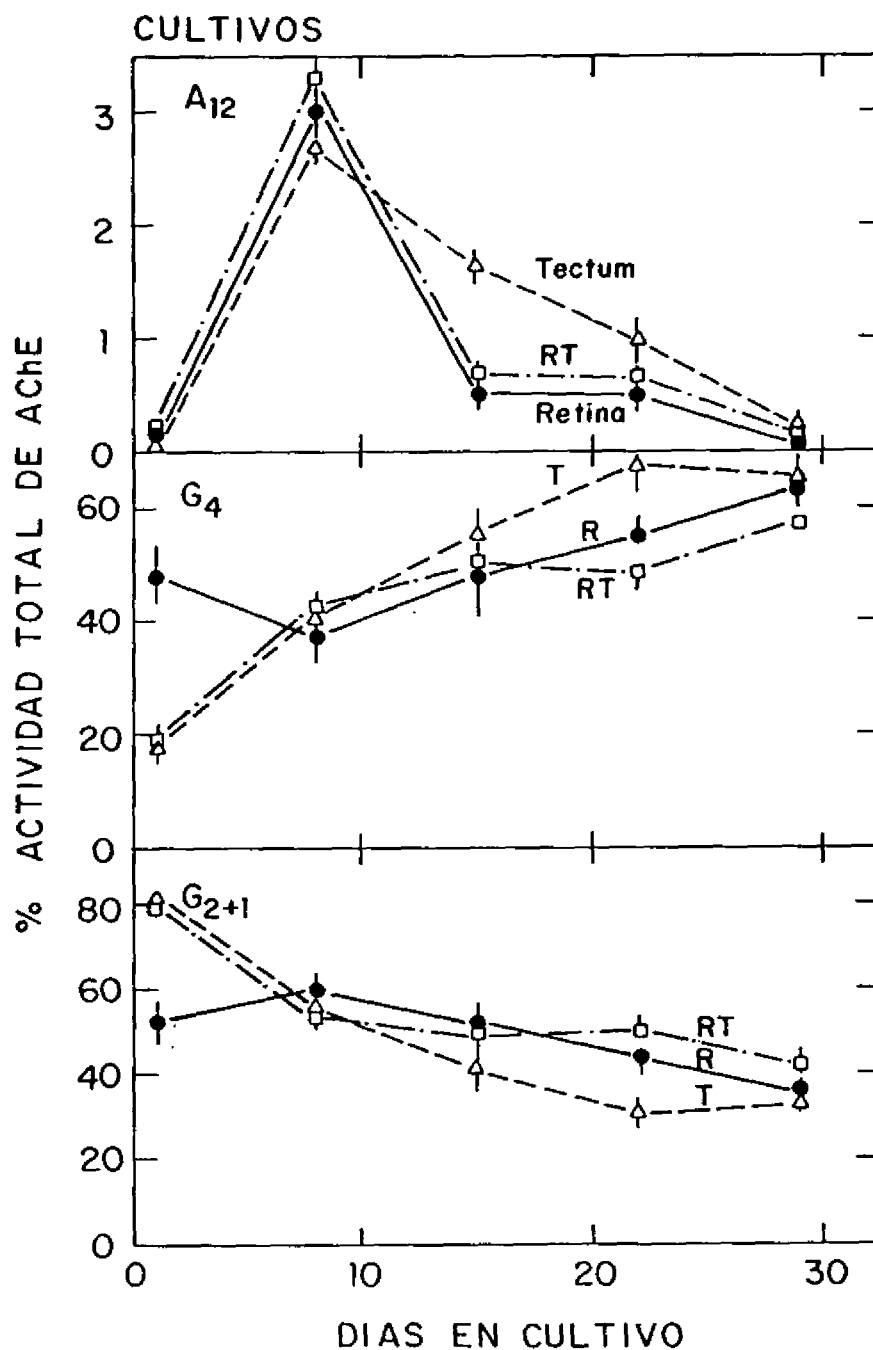


Figura 56.- Perfiles de sedimentación de las formas moleculares de AChE en cultivos de agregados. El material correspondiente a 2 Erlenmeyers de cultivo se extrajo 2 veces con 10 volúmenes de una solución: Iria-HCl 10mM, NaCl 1M, colato sódico 1% (p/v) y EDTA 2 μ M. La mezcla de los dos sobrenadantes se puso sobre un gradiente de sacarosa y se sedimentó durante 19 h. Los picos se designan por su estructura cuaternaria y su coeficiente de sedimentación. El panel superior izquierdo representa los resultados obtenidos en la retina; el panel derecho los del tectum y el panel inferior representa los resultados obtenidos en el coagregado retina tectum.



Figuras 52.- Perfiles de desarrollo de las formas moleculares de AChE en cultivos de reagregación celular. El panel superior, representa el % de A₁₂; el panel medio, representa el % de G₄ y el panel inferior, % de G₂₊₁. ● agregados de células de retina; Δ agregados de células de tectum y ◻ actividad en el coagregado retina-tectum. Los valores que se dan son la media ±D.E. de 3 a 5 experimentos.

4.5.2. Regulación por la función visual postnatal temprana.

Los estudios de privación luminosa permiten observar el efecto de la función visual sobre el desarrollo de las propiedades postnatales del sistema y especular sobre los posibles mecanismos que, como consecuencia de dicha experiencia funcional, contribuyen a la adaptación óptica del individuo al mundo que lo rodea.

Para estudiar el efecto de la privación se usaron pollos incubados y nacidos en la oscuridad a los que se les cose el párpado del ojo en el día del nacimiento y se les tapa con un parche opaco antes de que abran los ojos. En todos los animales utilizados se les cosió el ojo derecho, por lo que consideramos que la retina derecha es la privada y la retina izquierda la control y, el tectum izquierdo el privado (por ser el contralateral a la retina privada) y el tectum derecho el control.

Los tejidos de al menos 6 animales se homogeneizaron en una solución que contenía Tris 10mM, NaCl 1M, EDTA 2mM y colato sódico 1%. Los sobrenadantes obtenidos después de dos extracciones se juntaron y se colocaron sobre un gradiente de sacarosa, para determinar la actividad de AChE en cada una de sus formas moleculares. La actividad AChE en los picos del gradiente en el homogenado inicial y en la mezcla de los dos sobrenadantes, se cuantificaron por el método radiométrico. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla IX. Hay que añadir que estos resultados se compararon con los de pollos normales para examinar el control.

En la mayor parte de los casos los valores que se

obtienen son muy próximos a 1 y únicamente se da una disminución en la proporción de forma A_{1a} en la retina, por efecto de la privación. En el resto de los resultados las variaciones son del orden de $\pm 0,05$, por lo tanto no significativos.

TABLE IXACTIVIDAD AChE EN LA RETINA Y EL TECTUM DE POLLOS PRIVADOS DE VISION EN EL OJO DERECHO.

<u>RETINA</u>		<u>R_D/R_L</u>		
EDAD FORMA POSTNATAL A ₁₂ EN DIAS	ACTIVIDAD TOTAL (nmoles/min)	PROTEINA (mg)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmoles/min.mg)	%
1 1,00	1,20	1,03		1,08
2 1,00		1,00	1,09	0,92
6 0,93	1,06		0,97	1,09
10 0,82	1,02	1,00		1,02
20 0,66		1,06	1,06	1,00
<u>TECTUM</u>		<u>T_D/T_L</u>		
EDAD FORMA POSTNATAL A ₁₂ EN DIAS	ACTIVIDAD TOTAL (nmoles/min)	PROTEINA (mg)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmoles/min.mg)	%
1 0,91		0,98	0,90	1,08
2 1,00	0,93		1,02	0,91
6 1,00	0,93	0,04		0,99
10 --		0,92	0,97	0,95
20 --	0,92		1,01	0,91

Cociente de la actividad AChE total y específica del porcentaje de forma A₁e y cantidad de proteína entre retinas y tecta deprivados frente a controles.

* Valores no significativos.

4.5.3. Adición de drogas colinérgicas al huevo durante el desarrollo embrionario temprano.

Por último otra prueba que realizamos de manipulación embrionaria consistió en la adición de drogas al embrión "in ovo" (agonistas y antagonistas colinérgicos, factores tróficos y hormonales). Se trataba de ver como actuaban estas sustancias sobre los perfiles de sedimentación de la AChE.

Para ello se abre una ventana en el huevo aproximadamente a las 48 horas de iniciada la incubación para no perturbar al embrión, y se cerraba hasta el día 8º de desarrollo embrionario en que se volvía a abrir para introducir la droga disuelta en solución salina estéril. Se hacía difundir la solución por encima del embrión y se cerraba el huevo con un papel especial para que continuara su desarrollo. En el día 10º se extraía el embrión del huevo para analizarlo de forma tradicional. Se hicieron controles que contenían la misma cantidad de solución salina estéril que el huevo tratado, pero sin droga. Los resultados más patentes se obtuvieron cuando inyectábamos en el huevo atropina (antagonista colinérgico sobre el receptor muscarínico). Estos resultados se muestran en la Tabla X.

Se puede observar por una parte una reducción de la actividad AChE total al tratar los embriones con atropina en relación a los controles. Esta disminución es más drástica cuando se utiliza atropina en concentración de 500 nM que cuando la concentración es 10 veces menor. Por otra parte se observa que la reducción de AChE se da a expensas de las formas globulares principalmente (en retina y tectum). El

porcentaje de forma A₂ aumenta mientras que el de formas de baja velocidad de sedimentación disminuye, en la retina (en ambos casos) y en el tectum en presencia de atropina 500nM.

T A B L A

EFEECTO SOBRE LA ACTIVIDAD AChE DE LA ADICION DE ATROPINA A EMBRIONES DE POLLO.

<u>RETINA</u>				<u>A₁₆</u>				<u>G₂₄</u>	
<u>G₂₄₊₁</u>									
ACTIV	ACTIV	%AChE	ACTIV	%AChE	ACTIV	%AChE	ACTIV	%AChE	
TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	
CONTROL	2193	100,0	69	3,1	877	40			
1228	56,0								
ATROPINA	1065	48,6	56	5,3	473	44			
535	50,3								
50 nM									
ATROPINA	563		25,7	48	8,6	304	54		
210	37,4								
500 nM									
<u>TECTUM</u>				<u>A₁₆</u>				<u>G₂₄</u>	
<u>G₂₄₊₁</u>									
ACTIV	ACTIV	%AChE	ACTIV	%AChE	ACTIV	%AChE	ACTIV	%AChE	
TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	TOTAL	

Actividad AChE total y distribución entre las distintas formas moleculares de la AChE en embriones de pollo de 16 días, que

habían sido tratados con o sin atropina, en las concentraciones que se indican, en el día 89 del desarrollo. Los valores de actividad total se expresan como nmoles de acetato formados /min.mg proteína, y se expresan como porcentajes de la actividad en el homogenado inicial.

S . D I S C U S S I O N
S . D I S C U S S I O N

El sistema visual retinotectal del pollo es un modelo útil para el estudio de la integración y desarrollo de dos estructuras discretas, la retina y el tectum óptico dentro de un sistema funcionalmente coordinado (34).

Durante la maduración embrionaria y postnatal del sistema visual del pollo aparecen un gran número de sistemas de neurotransmisión que se van "activando" progresivamente, aportando así las bases bioquímicas para la operación de circuitos locales y de la conexión retina-tectum. Hemos creído por ello, que se trata de un sistema especialmente adecuado para analizar el desarrollo de la AChE, incluyendo los posibles efectos regulatorios de la conexión retinotectal y del comienzo de la visión.

Por ser la AChE un enzima polimorfo, es interesante enfocar el problema hacia la aparición de las distintas formas moleculares del enzima durante el periodo de desarrollo embrionario y postnatal que se estudia. Estas formas moleculares se han caracterizado por sus coeficientes de sedimentación.

5.1 SITUACION DEL SISTEMA VISUAL RETINOTECTAL DEL POLLO DURANTE EL PERIODO DE DESARROLLO CONSIDERADO.

5.1.1. Desarrollo "in vivo"

Como se indica en la Introducción, durante el desarrollo de un tejido se producen, a la par que cambios morfológicos,

una serie de cambios bioquímicos que nos pueden servir de índice del estado de desarrollo del sistema. Los cambios cuantitativos más notables que se observan afectan a la cantidad de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (1). Por ello, como marcadores generales del estado de maduración, hemos analizado en primer lugar el perfil de desarrollo de las cantidades de proteína y DNA total.

Los resultados obtenidos (Fig. 11) indican que durante el periodo de tiempo considerado, desde día 89 de desarrollo embrionario al 109 postnatal, se observan pequeñas variaciones en la cantidad total de DNA, mientras que se da una notable modificación de la cantidad de proteína en la retina y el tectum óptico. Esto daría idea de que durante este periodo de estudio ha cesado la proliferación celular, ya que el DNA prácticamente no aumenta, pero continua el proceso de diferenciación y maduración. El aumento progresivo de la relación proteína/DNA concuerda con esta interpretación. Todo ello concuerda con numerosos estudios (38,56,58,59) que indican que entre los días 69 y 129 del desarrollo embrionario del pollo, una vez concluida la proliferación celular, se establecen multitud de contactos sinápticos en la retina y el tectum óptico, estableciéndose algo más tarde, la conexión retinotectal propiamente dicha.

Durante el periodo de desarrollo considerado se puede observar un aumento en la actividad global de los enzimas colinérgicos (Figs. 12 y 13). Esta actividad enzimática se expresa como actividad específica (por mg de proteína del tejido) y como actividad total. Esto nos va a indicar si se da una síntesis preferencial del enzima que medimos frente al

resto de las proteínas del tejido (específica), o nos indicará una variación global de la actividad total (la total).

La actividad específica de AChE en la retina del pollo aumenta en el periodo de tiempo anterior a la eclosión del huevo y alcanza un valor máximo de 380 nmoles acetato formado/min. mg de proteína en el 1^{er} día de desarrollo postnatal, coincidiendo con el momento de la abertura de los ojos por el pollo; posteriormente se da una disminución de la actividad específica del enzima.

En el tectum, el perfil de actividad específica de la AChE muestra un alto grado de paralelismo con la retina durante el desarrollo embrionario. En este tejido se observa también un pico de actividad en el día 1^o, pero el máximo se alcanza en el día 6^o del desarrollo postnatal en el que la actividad específica (superior a la de la retina) es de 816 nmoles acetato/min.mg. A partir del día 6^o la actividad se reduce y en el pollo adulto (de 6 meses) es de 538. Esta disminución en la AChE entre el 1^o y el 6^o mes de vida ha sido también observada por Marchi y col. en el ganglio ciliar y en ganglios simpáticos del pollo (351).

La actividad total en ambas estructuras muestra lógicamente un perfil general ascendente, con el máximo en el punto de edad correspondiente al pollo adulto, dada la evolución de la cantidad de proteína que se presenta en la Fig. 11.

En general en los primeros días de desarrollo postnatal (puntos correspondientes al día 1^o y 2^o) se observa la aparición de "picos" en la curva que se corresponden con la abertura de los ojos del pollo y la recepción, por primera

vez, de la señal visual. Dacheux (51) y Sharma (52) señalan que este periodo genera notables cambios en las respuestas a la luz de las neuronas retinianas. Nuestros resultados indicarían que la actividad específica total de la AChE se ve afectada notablemente por estos cambios. Por otra parte, se da una mayor diferencia entre tectum y retina con la edad, apuntando a una incidencia potencialmente mayor de la AChE en la función neural en el tectum óptico. Esta ya había sido descrito por otros autores en el tectum óptico (352) y frente a otras regiones del sistema nervioso del pollo (353,354).

Estudios anteriores sobre la actividad AChE global en el sistema nervioso del pollo (incluyendo el sistema visual), usando técnicas bioquímicas e histoquímicas, han intentado establecer una correlación entre los cambios observados en la AChE durante el desarrollo y otros sucesos ontogénicos como por ejemplo, el crecimiento de las neuritas, la sinaptogénesis, la maduración fisiológica o el comienzo de la función (309,352,353,355).

La actividad de AChE se detecta por primera vez por medios histoquímicos en la retina entre el día 4º y 5º de desarrollo embrionario (356). En el tectum aparece anteriormente, entre el 2º y el 3º día (357). En ambas estructuras, el patrón de reacción "adulto" no se alcanza hasta el día 15º a 17º de la vida embrionaria, cuando la mayor parte de la actividad aparece asociada a las capas plexiformes. La maduración bioeléctrica ocurre entre los días 17º y 18º embrionario, que es cuando se tiene, por vez primera, capacidad de recibir señales luminosas (63,358). Los perfiles de desarrollo de la AChE de la Fig. 12 siguen, más o

menos, la maduración y organización funcional del tejido neural que hemos descrito.

Sin embargo, en el estado presente de nuestros conocimientos, no se puede establecer una relación rígida entre la aparición de AChE y la sinaptogenésis y/o el comienzo de la función, ya que muchos parámetros relacionados con la neurotransmisión presentan cambios muy similares a lo largo de ese periodo crítico.

Hay autores que asumen que la actividad global de AChE puede ser un marcador de sinapsis colinérgicas en algunos sistemas (309). Esto no es sin embargo, aceptado por la mayoría y se consideran que es la ChAT el marcador adecuado de inervación colinérgico. En el sistema visual del pollo se ha visto, curiosamente, una buena correlación entre los perfiles de desarrollo de la AChE total y el enzima responsable de la síntesis de la acetilcolina, la colina acetiltransferasa (ChAT) (359). En nuestro sistema concreto podemos observar un elevado grado de paralelismo entre las curvas de actividad específica de AChE y ChAT (Fig. 13). En otros tejidos la correlación es menor, como en la médula espinal del pollo, donde los mayores niveles de AChE se alcanzan antes que los de ChAT (360). Esto concuerda con las observaciones de Leyer, el cual supone que la aparición temprana de AChE tiene una función no sináptica (y que puede actuar como marcador de la diferenciación en el sistema visual) (203).

En cualquier caso está generalmente admitido hasta el momento presente, que la ChAT es un marcador mejor para reconocer los procesos sinápticos colinérgicos (1,121,122,361,362). El aumento en sinapsis colinérgicas

durante el desarrollo de la retina es un hecho descrito tanto en pollo (73,363) como en otros vertebrados (362,364).

5.1.2. Desarrollo en cultivos de agregados celulares.

Las técnicas de cultivo de tejidos neurales han recorrido un largo camino desde que Harrison en 1907, preparó por primera vez células vivas de nervio en cultivo. Las técnicas de cultivos han producido un gran impacto en muchas facetas de la investigación neurológica, incluyendo : desarrollo, genética, inmunología y toxicología (365).

Existen tres tipos básicos de cultivos primarios: los explantes, los cultivos en monocapa y los cultivos de agregados celulares. Cada uno de ellos presenta una serie de ventajas o desventajas según la aplicación a que se destinen. El cultivo de agregados presenta muy favorable en estudios sobre el desarrollo, en los que se requiere una interacción tridimensional libre, ya que la interacción de algunos tipos celulares es un suceso normal durante la embriogénesis (332). La utilización de cultivos de agregados tiene la ventaja de que las células en la mayor parte de los tejidos en desarrollo, muestran afinidades específicas por tipos celulares concretos dentro del propio tejido.

En los estudios en cultivo es importante comprobar que los parámetros de uso corriente para las medidas de desarrollo y diferenciación neural, imitan los principales sucesos que ocurren durante la maduración del sistema "in vivo". Esto junto con un mantenimiento sencillo, una supervivencia grande y accesibilidad en la manipulación, son los requisitos de un buen sistema de cultivos; requisitos que son cumplidos en

buena medida por el sistema de reagregados celulares.

Para ver la actividad de los enzimas colinérgicos en cultivos hemos realizado los mismos pasos que se habían realizado "in vivo". La cantidad de DNA y proteína medida a lo largo de casi un mes de cultivo de las células aisladas (Fig. 14 y Tabla II) nos indica que durante la primera semana se produce maduración celular y posible formación de contactos sinápticos. A partir del 8º día en cultivo este proceso cesa en parte de la población celular como lo indica la curva de DNA, que evidencia muerte celular pero. Otra porción del cultivo continua el proceso de diferenciación y maduración como se observa por el cociente proteína/DNA (Tabla II).

La observación microscópica de los agregados de células de 24 días (Figs. 15 y 16) está en total consonancia con los resultados obtenidos en los parámetros bioquímicos (Fig. 14 y Tabla II). Se puede observar que existe un periodo de tiempo (1ª semana) en el que se produce diferenciación y establecimiento de contactos sinápticos como indica el aumento de la cantidad de proteína pero posteriormente, a partir del día 8º en cultivo, se reduce la maduración y además hay una continua muerte celular (perfil del DNA decreciente).

La arquitectura celular de los agregados de retina y tectum mimetiza bastante bien el aspecto del tejido "in vivo", especialmente, en el caso de la retina. Presenta las típicas estructura en roseta que ya habían sido descritas por Sheffield y Moscona (366) y que recuerdan la organización de la retina "in vivo" (367,368). Las capas de esta estructura se disponen, sin embargo, en sentido inverso al tejido "in vivo"; la luz del agregado equivaldría a la capa pigmentaria.

En los agregados de tectum se observa muerte celular de manera más masiva que en los de retina, lo que no se puede atribuir al difícil acceso a los nutrientes a las zonas más internas del agregado ya que esto no ocurre en agregados de retina del mismo tamaño. A pesar de esto, se observa en las zonas corticales un estado de diferenciación avanzado que es posiblemente, lo que hace que se expresen los enzimas colinérgicos, además, con actividad específica notablemente creciente en la curva de AChE durante el periodo de desarrollo en cultivo considerado (Fig. 17) y también de la actividad ChAT en la retina (Fig. 18). Se observa que la ChAT es más sensible que la AChE a la desaferentación tectal como se ve en la Fig. 18 (panel inferior).

En cualquier caso tanto en los agregados de retina como de tectum se observa una estructuración histotípica en forma de capas, lo que indica posiblemente el reagrupamiento y formación de contactos sinápticos normales como había descrito Fujisawa en 1974 (368). Esto implica el mantenimiento de marcadores de diferenciación en cultivos de agregados de retina descritos por Okada (1983) durante tiempos de cultivo más prolongados que en monocapa (369).

Las actividades específicas de la AChE aumenta de forma destacable durante las cuatro semanas en cultivo, tanto en embriones de 7 como de 10 días (370). Esto ya había sido descrito en agregados de células de mamífero (370), y también la presencia de otros enzimas relacionados con la neurotransmisión como la tirosina hidrosilasa (332). Además de almacenamiento y liberación de varios neurotransmisores como acetilcolina, ácido γ -aminobutírico, dopamina, norepinefrina y

serotonina (345).

Las actividades enzimáticas en agregados son generalmente inferiores a las obtenidas "in vivo" (como se ha indicado en los Resultados). Esto es especialmente cierto en el caso del tectum en el que la actividad de ChAT es muy baja, sólo aumenta en la 1ª semana, lo que recuerda el comportamiento de un tectum óptico privado de inervación retiniana (357); así pues, el cultivo reproduce el comportamiento del propio tectum durante el desarrollo "in vivo" (Fig. 16). La desafferentación inherente a los agregados de tectum se traduce en una disminución más dramática de la ChAT que de la AChE, lo cual sugiere que el primer enzima se correlaciona mejor con el fenómeno de reconocimiento celular que conduce al establecimiento de contactos transitorios o permanentes entre células, incluyendo la formación de sinapsis. Esto ocurre también en agregados de cerebro de pollo (358).

Se puede distinguir un periodo de tiempo de 7 días (hasta el día 14º embrionario, si hacemos la corrección en relación a la edad del embrión) en que existe una organogénesis tectal en cultivo aparentemente autónoma, con un ligero aumento en la actividad de ChAT en tectum. Esto que concuerda con las observaciones de Cowan (8) sobre la existencia de un periodo de 12 a 14 días de desarrollo embrionario "in vivo" antes de que se detecten los efectos de supresión precoz de la copa óptica. Después de este periodo crítico, la ausencia de interacción retinotectal causa la degeneración masiva del tectum no inervado. La retina en cambio, presenta un mayor grado de independencia en cuanto a su capacidad de desarrollarse en cultivo en ausencia de

elementos tectales. Por otra parte se observa una relación más estrecha entre los perfiles "in vivo" e "in vitro" cuando se utilizan embriones más jóvenes (de 7 días frente a 10), en la preparación de los agregados (332).

En la proporción de AChE verdadera se observa un elevado grado de analogía en cultivos en relación a los porcentajes que se obtienen "in vivo" (Fig. 19). Esto es cierto en el tectum y en la retina. La proporción de colinesterasa verdadera (AChE) es bastante elevada en el sistema visual de las aves como se observa en la figura.

Los resultados obtenidos en cultivos de agregados confirman la validez de este modelo como herramienta para el estudio de las relaciones existentes entre los acontecimientos bioquímicos y morfológicos, durante la maduración del sistema nervioso.

5.2 ESTUDIOS SOBRE LA SOLUBILIZACION "IN VIVO" DE LAS FORMAS MOLECULARES DE AChE EN RETINA Y TECTUM.

Como ya se ha explicado, es difícil relacionar la variación de la actividad global de la AChE con el desarrollo y puesta en marcha de las sinapsis colinérgicas, a pesar de que el principal papel descrito para la AChE es la hidrólisis de la ACh (128,191) en dichas sinapsis. Como se ha comentado en la Introducción, la presencia de AChE en tipos celulares como los eritrocitos etc. (275) y además la descripción de una actividad peptidasa para la AChE (317,318) hacen pensar que la hidrólisis de ACh, no sea el único papel a asignar al enzima. Si bien es verdad, que en nuestro sistema de estudio existe una cierta correlación entre la actividad AChE global y la maduración sináptica, el conocimiento de la diversidad de formas de la AChE descrito por el grupo de Massoulié (228,230) en el órgano eléctrico de anguila y aplicable a todas las especies de vertebrados y también al pollo (274,321 y 322), nos hizo pensar en la necesidad de establecer una correlación más estrecha entre el polimorfismo de la AChE y el desarrollo del sistema retinotectal.

5.2.1. Formas asimétricas en la retina y el tectum del pollo.

En músculo de pollo se habían descrito 4 formas principales de AChE de coeficientes de sedimentación aproximados de 19,5S; 11,5S; 7,1S y 5,4S (es decir A¹, G₂, G_e y G₁).

Por otra parte estudios realizados por numerosos grupos atribuyen a la forma A_{12} un papel sináptico, teniendo en cuenta su regulación por la llegada del nervio a la membrana postsináptica (264,286) y su clara relación con la sinaptogénesis en el órgano eléctrico de peces. Todos estos datos estaban sin embargo en posible contradicción con la aparente ausencia de formas asimétricas en el sistema nervioso de vertebrados superiores (250,253,355). Esto hizo que antes de estudiar el desarrollo de las distintas formas moleculares de la AChE, intentáramos demostrar la presencia de formas asimétricas del enzima en el SNC.

Los resultados fueron satisfactorios (Fig. 20 y 21) ya que encontramos que la adición de EDTA a un medio con fuerza iónica alta producía por primera vez, la solubilización de formas A_{12} . El coeficiente de sedimentación de la forma obtenida coincidía con el descrito para la forma A_{12} del músculo del pollo (279,322) por lo grupos de Vigny y Rotundo (279,322), que era alrededor de 20S (Fig. 23 y 24 y Tabla IV). El tratamiento con colagenasa (Fig. 22) demostró la existencia en esta estructura de una cola semejante al colágeno, como había sido descrita para la forma A_{12} en otros tejidos como gánglios y músculo (242,250,258,280,325) y en todos los grupos de vertebrados estudiados (240,247,279).

Se puede ver que, en la retina y el tectum del pollo, la presencia de EDTA, en el medio de homogenización, parece ser el único requerimiento absoluto para la liberación de las formas con estructura de cola (además de la alta concentración de sal). La A_{12} de pollo agrega en ausencia de sal, lo que es una característica típica de las formas A (255). La presencia

de detergente (además de EDTA) aumenta muy poco el rendimiento en formas asimétricas, siendo su efecto probablemente indirecto.

La liberación de la A_{12} de la membrana cuando se añadía un agente quelante como el EDTA (o también el EGTA), hacía pensar en la posibilidad de que o bien existía una proteasa activable por Ca^{2+} que producía la hidrólisis de la forma A_{12} cuando no se eliminaba el calcio del medio, o bien que este ión (u otro divalente) estaba implicado en el anclaje del enzima a la membrana. En contra de la primera posibilidad está el hecho de que el enzima solubilizado con EDTA puede ser agregado por Ca^{2+} y recuperado cuantitativamente en solución, bloqueando el Ca^{2+} añadido con EDTA (Fig.25). El mecanismo de anclaje via Ca^{2+} ha de explicar dos hechos experimentales:

1º. Los cationes divalentes (el Ca^{2+} es mejor candidato que el Mg^{2+} , ya que actúa en concentraciones fisiológicas), producen agregación de las formas A_{12} del enzima, pero se vuelven menos eficientes conforme avanza el proceso de purificación (Tabla IV), siendo muy poco agregativos con el pico 20S aislado.

2º. La presencia de detergente en el medio parece impedir la agregación. Esto es más patente con el detergente no iónico Tritón X-100 que con el detergente iónico colato sódico (Fig. 25).

La explicación que concibiría estos dos hechos sería, la existencia de una molécula unida a la cola por interacciones hidrofóbicas que forma además, un puente de Ca^{2+} con la membrana o matriz extracelular a la que se fija la cola del enzima. A este respecto, hay que recordar que la forma A_{12}

después del tratamiento con colagenasa no agrega por acción del calcio.

La acción del Ca^{2+} en relación a la AChE ha sido discutida por varios autores. Por una parte se ha visto que el Ca^{2+} parece regular la actividad catalítica de la AChE (277,371). Por otra parte se ha visto la implicación del Ca^{2+} en el mecanismo de asociación de la AChE a las membranas colinérgicas, tanto en órgano eléctrico (Dudai y Silman, 231,240) como en el SNC de mamíferos (Hollunger y Nikleson y Chan y col. 372,373). Sin embargo, en el órgano eléctrico el EDTA no es un requerimiento absoluto para la solubilización de las formas A de la AChE e incluso los cationes divalentes son capaces de la solubilización de formas asimétricas del enzima (245,271), mientras que en la retina una concentración de Mg^{2+} 40mM bloquea completamente la liberación de la forma A₁₂. (Esta contradicción se resuelve por la existencia de dos tipos diferentes de formas asimétricas (como se ha indicado en los Resultados) de las que se hablará más adelante).

Hemos visto también por nuestros experimentos, que la forma A₁₂ no extraída con EDTA va degradándose progresivamente (tabla VI) y no es posible extraerla pasado un tiempo crítico, ni con EDTA. Este hecho, junto con otros experimentos realizados en el laboratorio, parecen indicar la existencia de una proteasa estructural que opera solamente sobre formas asimétricas inmovilizadas.

Respecto de la hipotética molécula unida a la cola que participa en el enlace puente de Ca^{2+} ; podría tratarse de un elemento estructural de la membrana o de la matriz extracelular. La asociación de la AChE con lípidos y

fosfolípidos ha sido descrita por varios autores (233,374,375). También ha sido descrita la unión de las formas asimétricas a componentes de la matriz extracelular (376) como la fibronectina (377) y proteoglicanos derivados del heparan sulfato (289,290,378).

5.2.2. Extracción de formas asimétricas en el músculo esquelético del pollo y en otras especies de vertebrados.

Nuestros estudios en busca de una solución de extracción que mejorase el rendimiento en formas asimétricas, y el posterior descubrimiento del efecto del EDTA, nos llevaron a analizar otros tejidos en los que se había descrito con anterioridad la existencia de formas asimétricas extraíbles simplemente, con alta concentración de sal.

El análisis secuencial del músculo esquelético del pollo nos confirmó la existencia de 2 clases de formas asimétricas de AChE: la clase A¹, que son las formas asimétricas que sólo necesitan de alta concentración de sal para su solubilización y que confirmaban los estudios realizados por otros grupos con anterioridad (228,230,231 y 232) y las formas A¹¹ que requerían la presencia de EDTA para su extracción (Fig. 27, y 28 y Tabla VIII), y que eran las que habíamos encontrado en la retina y el tectum del pollo (Tabla VIII). Esto explicaba el hecho indicado por Silman y col. de un mayor rendimiento en formas A en el músculo cuando añadían EGTA (378).

La descripción de este tipo de anclaje y las interrelaciones existentes entre las dos formas A¹ y A¹¹, son uno de los objetivos que se nos plantean a corto plazo.

La aplicación del medio de extracción con EDTA a la

solubilización de las formas A en retina y mesencéfalo de 7 especies de vertebrados distintos del pollo (Fig. 26 y Tablas VII y VIII) supone la generalización de nuestros hallazgos en la retina y el tectum del pollo. El EDTA y la alta sal, sin necesidad de detergente, son capaces de solubilizar las formas A del SNC. De todas las especies de vertebrados analizados, pudimos observar que el medio de extracción utilizado era, en general, más eficiente en las especies de vertebrados inferiores. En mamíferos los porcentajes obtenidos eran muy bajos (Tabla VII). Este hecho había sido comentado por varios investigadores (251,257,258,259,280). Para ver si esto refleja la situación "in situ" se requieren experimentos de solubilización más completos.

La extrapolación de los estudios sobre las dos clases de formas A (encontradas en el músculo de pollo) al estudio de la ACHE en SNC de vertebrados (Tabla VIII), indicó la presencia de los dos tipos de formas A, en los casos que se muestran. Habría que destacar que en el pollo la relación A^1/A^{12} es muy baja, del 0,095 en la retina y 0,08 en el tectum. En el cerebelo no se detectó forma A^1 . Esto explica que el rendimiento en formas A sea prácticamente nulo cuando se realiza la extracción sin EDTA. En el resto de las especies, se observa que en el SNC presentan una proporción bastante más elevada de formas de la clase I. Esto ocurre también en el órgano eléctrico de pez torpedo donde la relación A^1/A^{12} es de 2,3 (379).

El interés en la obtención de formas A (y que nos hizo detenernos en esta etapa antes de avanzar en los estudios sobre el desarrollo) era ver si estas formas del enzima

permitían establecer una relación más directa entre actividad enzimática y la función sináptica. Aunque los datos que se poseen en la actualidad no son suficientes para establecer esta relación, el descubrimiento de las dos clases de formas A a pesar de complicar el polimorfismo de la AChE, puede indicar que si no toda la A₁e, al menos una de las dos clases podría tener un papel fisiológico más destacado en la hidrólisis de la ACh en las sinapsis colinérgicas. Resultados que no se muestran en este trabajo (350,379), demuestran la dificultad de asignar un papel o localización específica a cualquiera de estas dos clases de enzimas asimétricas. Aunque los estudios de denervación demuestran claramente su regulación diferente.

En esta tesis lo importante es sin embargo, el establecer la existencia de AChE asimétrica en retina y tectum de pollo hecho que había sido negado en publicaciones previas.

Con estos datos podemos pasar a estudiar las formas asimétricas, dentro de la distribución general de formas de AChE, durante el desarrollo de la retina y el tectum del pollo.

5.2.3. Formas globulares en el sistema retinotectal del pollo.

Aunque los estudios de solubilización de las formas de AChE en retina, tectum y músculo esquelético de pollos de 10 días (Fig. 20-28 y Tablas III a VIII) iban especialmente dirigidos al estudio de las formas asimétricas, de todos estos experimentos podemos obtener información sobre las formas globulares, que como hemos comentado, no podemos pasar por alto sobre todo en relación al comportamiento en presencia de detergente, pues no hay que restar importancia a estas formas

menos complejas que a las estructuras con colá.

Las formas globulares se consideraron en los primeros estudios realizados en anguila (240,242,243.) como posibles intermediarios de síntesis o degradación de las formas A (más complejas). Aunque esto pueda ser cierto, en estudios pioneros realizados también en el órgano eléctrico, pero en este caso de pez torpedo, se observó por una parte que la proporción de formas globulares era superior a la encontrada en anguila (250,251,254) y además la presencia de formas hidrofóbicas (posiblemente unidas a membrana ,Fig. 9) (202,264,269,272,381), hacía pensar en un papel fisiológico concreto para estas formas. Estos descubrimientos y la observación en vertebrados superiores y en el hombre de la existencia de dos poblaciones de formas G (una de ellas que requiere detergente para su extracción) hacen, que en la última década los estudios de investigación sobre la AChE tengan muy presentes dichas formas (261,264,274,286,305).

De una forma resumida, los estudios sobre la solubilización de la AChE en pollos de 10 días indican por una parte, que las diferencias en los porcentajes de solubilización del enzima con y sin detergente, (del 33 al 98% tabla III), se deben a que el detergente extrae un número superior de formas globulares, probablemente hidrofóbicas. También se observa una distribución de proporciones distinta al usar colato, frente a Tritón X-100, y también cuando se añade EDTA. Estas últimas variaciones son de pequeña cuantía y las causas no están aún bien determinadas.

En conclusión, el detergente solubiliza una subclase de formas globulares a las que hemos llamado G^D (que requieren

detergente para su solubilización). Estas formas se corresponden con las solubles en detergente (DS o S₁) descritas en la literatura (244,261,286,305). Esto nos ha sugerido un análisis de dichas formas por separado durante el desarrollo, con medios de extracción diferenciales para distinguir las de las formas G^S, solubles en baja concentración de sal (LSS o S₂ en la literatura) y que hemos visto que en la retina del pollo constituían alrededor de un 20 a un 26% (toda la AChE que extraíamos sin detergente a excepción de las formas A). La extracción de formas G^S se ve incrementada de alguna forma por acción de EDTA (Tabla III), aunque estas formas no agregan con Ca²⁺ ni Mg²⁺, por lo que ello se debe probablemente a un efecto indirecto al minimizar el atrapamiento por las membranas.

Finalmente nuestros resultados indican que en presencia de Tritón X-100, las formas globulares (es de esperar que sólo una subclase de ellas pero que es la mayoritaria) exhiben un coeficiente de sedimentación de alrededor de una unidad S menor de lo que se obtiene sin detergente o con colato (Figs. 23 y 24 y Tabla IV). Grassi y col. (261) han observado que el enzima solubilizado de núcleo caudado de bovino presentaba este mismo efecto. La diferencia observada pudiera explicarse como una interacción del enzima con el detergente y este complejo detergente-enzima puede mostrar una densidad menor, que se corresponde con un volumen específico parcial mayor que el del enzima sin detergente, por la baja densidad de estos (274,381).

Se ha analizado también la eficiencia del colato en la solubilización de las formas G. Nuestros resultados indican

que la extracción de formas G no requiere EDTA y sí detergente para su solubilización total; la acción del EDTA resulta "beneficiosa" para mantener esas formas en solución por algún mecanismo indirecto.

5.3. DESARROLLO 'IN VIVO' DE LAS FORMAS MOLECULARES DE AChE EN EL SISTEMA RETINOTECTAL.

El estudio pormenorizado de las formas asimétricas y globulares de la AChE (en sus diferentes tipos) en el sistema retinotectal en desarrollo lo abordamos aplicando los resultados que los estudios sobre la solubilización nos habían aportado.

5.3.1. Desarrollo de formas asimétricas en la retina y el tectum del pollo. Comparación con los resultados obtenidos en el músculo esquelético.

La extracción de formas moleculares de AChE a lo largo del desarrollo de la retina y el tectum con la solución de extracción clásica sin EDTA (perfiles de sedimentación de las Fig. 29 y 30), nos indicó que (como habíamos observado en nuestros estudios de solubilización en general en pollo de 10 días), en estos tejidos no existían prácticamente formas asimétricas de la clase I, es decir sin EDTA no se extraían cantidades apreciables de formas asimétricas en el periodo de desarrollo del sistema visual retinotectal estudiado.

Al introducir el nuevo medio de solubilización (con EDTA), que era capaz de solubilizar formas de la clase II, pudimos obtener formas asimétricas (en SNC de pollo sólo A_{12}). Por los resultados mostrados en las figuras 29 y 30 estas formas A_{12} pertenecen realmente a la clase II.

Las formas A_{12} que se muestran en los perfiles de desarrollo, tenían un coeficiente de sedimentación de alrededor de 20S, lo cual coincidía con los resultados

obtenidos previamente en otros tejidos de pollo, tanto en sistema nervioso periférico como en músculo (258,309,322,323,382). Estas formas de clase II también manifiestan agregabilidad a baja concentración de sal y sensibilidad a la colagenasa al igual que en otros tejidos (322,382).

Un hecho destacable en los perfiles de desarrollo que se muestran, es que la proporción relativa de forma A_{12} es distinta en la retina y el tectum (Fig. 31). Así, mientras que antes del nacimiento la forma A_{12} representa del 2 al 3% de la actividad total de la AChE y el porcentaje postnatal alcanza valores de hasta un 10% a los 6 meses, en el tectum disminuye hasta prácticamente desaparecer en el pollo adulto. Este hecho se refleja también en las actividades total y específica de la forma A_{12} (Figs. 32 y 33 paneles superiores) aunque en distinta medida.

Es importante resaltar que a pesar de que existe una mayor actividad global en el tectum (Fig. 12), la actividad de la A_{12} en la retina supera a la del tectum tras el establecimiento de la función visual, a excepción del primer día posteclosión en el que se muestran notables cambios en la actividad del tectum (de los que ya hemos tratado), y que podrían deberse a la apertura de los ojos del pollo. Estos resultados obtenidos con las formas asimétricas de la AChE sugieren que si la forma A_{12} estuviera específicamente asociada con la membrana postsináptica, el establecimiento de relaciones directas entre los niveles totales de AChE, y la maduración de la neurotransmisión colinérgica conduciría a graves errores de apreciación (326).

La desaparición progresiva de las formas A durante el desarrollo ha sido ya descrita en el caso de músculos de tono lento en el pollo por Lyles y Barnard (383). Estos modelos no excluyen el posible (aunque no necesariamente exclusivo) papel postulado por distintos autores para las formas asimétricas como formas sinápticas (255,297,298) ya que la estructura molecular y el mecanismo funcional de las sinapsis colinérgicas puede variar según el tejido. Así, las diferentes sinapsis pueden requerir distintas poblaciones de moléculas de AChE para su funcionalidad y este ajuste puede ocurrir tras el crecimiento, cuando la función ha sido establecida.

El perfil de desarrollo de la retina, quizá por ser un tejido algo menos evolucionado y que se conserva con pequeñas modificaciones a lo largo del desarrollo filogenético, adquiere un patrón más "clásico" incrementándose con la edad la cantidad de forma A_{12} como ocurre en otros tejidos del sistema nervioso periférico y músculo de pollo (255,257,280) y en otros vertebrados (130,255,297,298,308).

No podemos ni es el objetivo de este trabajo, establecer un papel sináptico claro con estos datos para la forma A_{12} , ya que se precisa evidencia directa. La comparación de los perfiles de A_{12} en retina y tectum con los de la ChAT (Fig. 13), indican que especialmente en este último caso no se observa un paralelismo claro entre las dos actividades enzimáticas que pudiera apoyar la hipótesis inicial. Por lo tanto a la vista de los perfiles de desarrollo de A_{12} de retina y tectum de pollo no se puede afirmar que esta forma molecular de la AChE sea (al menos en solitario) la responsable de la actividad sináptica de este enzima. Se

necesitar estudios bioquímicos y electrofisiológicos que nos permitan aportar más datos. También con esta idea se realizaron estudios de regulación de la interacción celular y de modificación de la función visual que se discutirán más adelante.

5.3.1.1. Estudio de las formas asimétricas durante el desarrollo del músculo esquelético.

El estudio del músculo en desarrollo, en el que hemos encontrado las dos clases de formas A podía aportar tal vez, más información sobre los puntos anteriormente comentados, ya que el análisis comparativo de las dos clases de formas A no puede realizarse en el sistema retinotectal, que prácticamente contiene solo enzima asimétrico de tipo II. Nuestros resultados iniciales indican que mientras en la retina y el tectum de pollos de 10 días el cociente A^I/A^{II} es menor de 0,1 (Tabla VIII), en el músculo esquelético de pollo de la misma edad la razón entre las dos formas era próxima a 1 (Fig. 28). Por lo tanto en este tejido se podía llevar a cabo el estudio comparativo del desarrollo de ambas clases de formas A.

Tanto en el desarrollo del músculo (Figs. 41,42) como en sistema retinotectal podemos observar que la aparición de las formas moleculares de la AChE no es simultánea, siendo las globulares más precoces, lo cual indicaría una regulación del ensamblaje de AChE por el desarrollo del sistema como habían apuntado Rotundo y Fambrough (322) en trabajos realizados también en el músculo de la pata del pollo.

En el músculo (Fig. 43) observamos un aumento muy marcado de formas asimétricas tras el nacimiento. Esto indicaría que

se requiere la síntesis de formas asimétricas como respuesta a la nueva situación, tras la eclosión, del pollo. Como se ha indicado en la Introducción, existe una relación entre la proporción de formas asimétricas y la llegada del nervio al músculo (255,295,296,297,384). Desde esta perspectiva, los resultados obtenidos serían el reflejo de la regulación y acoplamiento de esta serie de sucesos y la síntesis de enzima. Todos estos datos están en concordancia con numerosas investigaciones.

Los resultados principales que aporta este trabajo se refieren a las dos clases de formas A como se muestra en las Fig. 41 y 42. En el músculo las formas asimétricas están representadas sólo por formas $A\phi_{1,2}$.

La mayor complejidad de las relaciones que el enzima de la clase II establece con la membrana, haría suponer que se trataba de una forma más evolucionada y por lo tanto esperaríamos su aparición con posterioridad a la de las formas A^1 . Nuestros resultados muestran que esto ocurre así y que el cambio de proporciones más dramático ocurre entre el periodo embrionario y postnatal (Fig. 40). En el primer punto de desarrollo considerado, embriones de 8 días, las formas A^1 representan un 5% de la actividad AChE frente al 2% representado por la formas $A^{1,2}$. Tras el nacimiento la proporción de $A^{1,2}$ aumenta

El hecho de que tras el nacimiento se produzca un aumento de las formas de clase II podría indicar una función específica para estas formas relacionada con el incremento brusco de la actividad muscular que sigue a la eclosión. En todo caso, estos perfiles de desarrollo no nos permiten por el

momento asignar una misión específica a una u otras de las dos clases de formas asimétricas. Sin embargo, es importante constatar que dichos perfiles vienen a confirmar claramente la individualidad de ambas clases de enzima, dando una mayor significación biológica a lo que ha comenzado siendo una simple deficiencia en mecanismo de anclaje.

5.3.2. Desarrollo de formas globulares en la retina y el tectum del pollo "in vivo".

En nuestro sistema de estudio (Tabla III), así como en general en SNC de aves y mamíferos (242,247,251,279,309), las formas globulares son las mayoritarias. En otros tejidos como eritrocitos son incluso las únicas (275). Además en la actualidad su estudio ha cobrado gran relevancia pues se les atribuyen (especialmente a la forma G_4) papeles que tradicionalmente se identificaban exclusivamente con las formas A. La probada unión a membranas de las formas G (250,280) y su posible localización sináptica en algunos casos, hacen que resulte obligado un estudio detallado de estas formas dentro del objetivo general del trabajo.

Los altos niveles de actividad ACHE que se alcanzan en el tectum frente a la retina (Fig. 12), tanto por mg de proteína como por pollo, se deben como se deduce de la Fig. 31 a la distinta proporción de formas G_4 que tienen ambos tejidos; del orden de 5 veces más de actividad total en el tectum que en la retina (si nos fijamos en la distinta escala de la Fig. 33). Este aumento proporcional de formas G_4 frente a G_{2+1} se ha observado en músculo estriado y en varias áreas del cerebro de rata (385,386).

Las actividades específicas de las formas de menor velocidad de sedimentación (G_2 y G_1) son, sin embargo, comparables en la retina y el tectum (Fig. 32). Además, la actividad específica de estas formas permanece prácticamente constante a lo largo del periodo de tiempo considerado. Este hecho había sido observado por Marchand y col. (355) y son sustancialmente semejantes a los resultados de Rieger y Vigny en cerebro de rata. También concuerda con el hecho propuesto por algunos autores de que G_1 y G_2 son precursoras de G_4 (249); la cantidad de formas globulares de menor tamaño se mantendría constante porque irían ensamblándose a G_4 en proporción o velocidad semejante a la de su propia síntesis.

5.3.2.1. Desarrollo de formas globulares solubles en detergente.

Los estudios de solubilización realizados en pollos de 10 días mostraban claramente la existencia de formas (globulares) de la AChE que requerían detergente para su extracción (Tabla III). Además observamos que estas formas interactuaban con el Tritón X-100 ya que en presencia de dicho detergente el coeficiente de sedimentación se reducía a una unidad, fenómeno ya descrito en la literatura para estas formas (261,274,381).

El estudio de las formas G hidrofóbicas se está abordando en la actualidad con bastante interés por numerosos grupos de investigación que trabajan con la AChE (122,274,275,277,278). Hay que destacar que el término de formas solubles en detergente (G^D) que hemos empleado en el presente trabajo se adapta mejor a nuestros resultados ya que el criterio de hidrofobicidad varía según los autores. En otros casos se

habla de formas unidas a membrana (381), pero estos términos deben de manejarse con precaución cuando se trabaja con el enzima purificado ya que la AChE tiene afinidad por moléculas que pueden proporcionar la hidrofobicidad. Estas moléculas pueden constituir parte de la estructura de la membrana en la que el enzima se encuentra anclado (381). En cualquier caso se ha probado la existencia de dichas formas hidrofóbicas en preparaciones del enzima con bastante grado de pureza (236,286).

La reproducibilidad de nuestros resultados por distintos métodos de extracción sugeriría que las diferencias de solubilidad mostradas por los dos tipos de estructuras (formas G^P o solubles en baja concentración de sal y formas G^D que requieren detergente para su extracción) se deben a su estructura intrínseca. Nuestro método de ensayo secuencial coincide con los métodos idóneos descritos en la literatura para la extracción de estas formas (391).

Nuestro estudio trata de ver la distribución comparativa de los dos tipos de formas G (que difieren en cuanto a requerimiento de detergente) en la retina y el tectum óptico a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal (hasta el día 20) del pollo (Fig. 34-39). Se observa que en los primeros días de desarrollo embrionario estudiados, 8^o y 12^o, la actividad total de AChE que como hemos indicado anteriormente, se distribuye entre las formas globulares es de alrededor de un 50% de formas G^P y G^D en retina (Fig. 34 y 35) y en tectum (Fig. 36 y 37). Esto queda también reflejado en el perfil del cociente entre los dos tipos de formas (Fig. 38 y 39). A lo largo del desarrollo, la fracción G^P pasa de 50 a un 65% en la

retina y del 50 al 80% en el tectum, mostrando un perfil creciente a lo largo de prácticamente todo el desarrollo. Esto indica que coexisten los dos tipos de fracciones con predominio de las G^D (Fig. 38 y 39, cociente G^E/G^D menor que 1 y decreciente).

El aumento en formas G^D (global) a lo largo del periodo de tiempo considerado es debido aparentemente a las formas G_4 , ya que los perfiles de las formas de menor velocidad no señalan el predominio claro de ninguno de los dos tipos de formas G . Esto concuerda con numerosos estudios realizados en distintos sistemas (322,385,386).

Hay que destacar también en estos resultados los "picos" observados en los primeros momentos tras la eclosión. Esto podría apuntar hacia un efecto regulador de la estimulación visual por aparición de la señal luminosa, no sólo a nivel de la AChE global, sino también en la distribución relativa en todas sus formas moleculares.

Nuestros resultados muestran por una parte el elevado porcentaje de forma G_4 en el desarrollo postnatal y especialmente en la forma que requiere detergente. Esto coincide con el periodo de acumulación de membranas y crecimiento de axones y dendritas y concuerda con los resultados de numerosas investigaciones tanto en músculo y ganglios de pollo (290,321,355) como en otros tejidos de vertebrados (250,274,277,386,388,389).

En cuanto a la función, muchos trabajos apuntan a que la forma G_4 hidrofóbica se encuentra en la vecindad de la sinapsis anclada en la membrana plasmática (250,258,275,280,313,389).

El papel de las formas G^B no está claro aún, aunque podrían ser simplemente precursoras o productos de degradación de las formas asimétricas que no contienen al parecer monómeros hidrofóbicos.

No se conoce bien en la actualidad, si el origen de las formas hidrofóbicas obedece a la existencia de genes específicos (277), o si se producen por modificaciones postranscripcionales o postraduccionales (251). Todos los resultados apuntan a que las formas G^D y G^B posean distinta localización celular, de lo que derivaría probablemente su implicación en distinta función.

5.4. DESARROLLO DE FORMAS MOLECULARES DE AChE EN CULTIVOS DE RETINA Y TECTUM.

El desarrollo de la AChE en cultivo presenta propiedades satisfactorias (Fig. 17). Por ello decidimos abordar el estudio de las formas moleculares con el fin de ver si nuestro sistema de cultivos reproducía los resultados observados "in vivo", lo que haría de este sistema una herramienta de trabajo útil para posterior estudio sobre regulación, síntesis e interconvertibilidad entre las distintas formas.

La mayor parte de los estudios en cultivo se han realizado con células de músculo (259,297,322,390) o de sistema nervioso periférico (310,392). Nosotros queríamos probar si se producía la expresión de todas las formas de AChE que habíamos descrito "in vivo" en cultivos de reagregación celular. Nuestros resultados muestran la aparición en la retina y el tectum de las formas de AChE descritas en estos tejidos "in vivo".

Podemos observar la aparición de formas A_{12} (Fig. 44-46) en una proporción muy baja, como corresponde al estado de desarrollo embrionario. Esta actividad aumenta en la primera semana en cultivo. A partir de este momento del desarrollo, tanto la proporción en dicha forma, como sus actividades específicas y totales decaen, reduciéndose hasta llegar a valores próximos a cero después de 29 días en cultivo.

El perfil que hemos obtenido para la forma A_{12} en cultivo recuerda al que presenta esta forma "in vivo" en el tectum. Si hacemos la corrección de la edad de los tejidos, por adición

de los 7 días de incubación del embrión previos a la puesta en cultivo podemos ver al igual que ocurre con la A_{12} de tectum durante el desarrollo "in ovo" que la actividad aumenta durante los dos primeros estadios del desarrollo considerados. En el embrión in vivo la A_{12} se estabiliza hasta el día 109 postnatal en tectum mientras que en cultivo se produce un decrecimiento constante. La aparición de formas A_{12} en cultivo ha sido observada en varios sistemas, especialmente en el músculo de pollo y rata (297,322,391) e incluso se ha demostrado su externalización (392) y su ensamblaje intracelular (393). El grupo de Inestrosa ha encontrado que la forma A_{12} producida en cultivo posee las mismas propiedades que el enzima sintetizado "in vivo" en cuanto a la agregación a baja fuerza iónica y el efecto de la collagenasa (393,394,395).

Nuestros estudios prueban la aparición de formas A_{12} , G_4 y G_{2+1} en cultivo. Se requieren estudios de extracción diferencial y con inhibidores, para que podamos asignar una localización celular a las distintas formas del enzima.

Los perfiles de desarrollo de la proporción de formas G totales en sus formas estructurales G_4 y G_{2+1} muestran un patrón muy similar de desarrollo "in vivo" y en cultivo (Fig. 31 y 44). Se observa una proporción creciente de forma G_4 al avanzar el desarrollo, muy similar en ambos casos. Las curvas de actividad específica de G_4 por ejemplo, se mantienen en aumento durante un tiempo mayor en cultivo que "in vivo" (Fig. 32). Esto parece indicar que la degradación de proteínas que ocurre durante el desarrollo en cultivo (Fig. 14) pudiera afectar en menor proporción a la AChE que a otras proteínas

del tejido. También podemos observar que la curva de actividad específica de G₄ en cultivo sigue fielmente, los perfiles de desarrollo de la actividad AChE global (Fig. 17) en retina y tectum, como cabría esperar por ser la forma mayoritaria (alrededor de 60 al 70% de actividad en los últimos días considerados) en ambos tejidos.

5.5. REGULACION DEL DESARROLLO DE AChE POR INTERACCIONES CELULARES EMBRIONARIAS Y VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD VISUAL POSTNATAL.

Durante el desarrollo postnatal temprano observamos en los perfiles de actividad AChE cambios notables coincidentes con el periodo de apertura de los ojos del pollo y la adaptación de este al entorno. Los estudios de regulación de la función visual nos pueden dar información de la variación del desarrollo de la AChE por modulación de factores intrínsecos o ambientales. Con este objeto se han sometido a los animales de experimentación a enucleación, privación, adición de drogas "in ovo" y también hemos analizado el efecto que tiene sobre la AChE la coagregación celular en cultivo.

5.5.1. Regulación del desarrollo de la AChE por interacciones celulares.

El establecimiento de conexiones interneuronales específicas durante el desarrollo es la clave de la complejidad estructural y funcional del sistema nervioso adulto. La sorprendente reproducibilidad del patrón general de conexiones intercelulares (sinápticas o de otro tipo) pudiera explicarse, bien por una secuencia cronológicamente ordenada de fenómenos celulares y extracelulares (división, migración ...) que asegurasen la toma de contacto de las células pertinentes en el momento adecuado del desarrollo, o bien por la presencia, en la membrana de las células complementarias, de moléculas específicas capaces de reconocerse y de

determinar interacciones temporales o permanentes, con independencia de una sincronización precisa en el desarrollo de los diversos grupos celulares implicados en el establecimiento de un sistema funcionalmente coordinado (252). El sistema visual, tanto en vertebrados como en invertebrados, ha sido repetidamente utilizado para estudiar la interacción entre sistemas neuronales que deben establecer conexiones específicas durante el desarrollo como requisito previo al establecimiento de una función (357).

Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que ambas hipótesis sobre el mecanismo de reconocimiento interneuronal pudieran ser al menos parcialmente ciertas. En general, en estos trabajos mencionados se han utilizado criterios morfológicos para definir las diversas interacciones. Nuestro enfoque, sin embargo, se basa en el postulado de que toda interacción intercelular en el sistema nervioso debe tener consecuencias funcionales medibles a corto o largo plazo. Esto se cumple claramente, en el caso de la formación de sinápsis, aunque no sea éste el único tipo posible de interacción específica en el sistema nervioso.

Con el antecedente de que el desarrollo del sistema colinérgico en el tectum óptico del embrión de pollo depende de la llegada puntual al tectum de las fibras del nervio óptico (399), nos hemos decidido precisamente a estudiar cómo diversas formas de interacción entre la retina y el tectum del embrión de pollo influyen en la ontogenia del sistema colinérgico de neurotransmisión en ambas estructuras.

Con el fin de poder valorar la importancia de factores temporales y de sincronización entre las poblaciones

neuronales retinianas y tectales hemos puesto a punto un sistema "in vitro" que permite variar artificialmente el momento del desarrollo en que la retina y el tectum comienzan su interacción.

El sistema visual del pollo es muy adecuado para este tipo de investigación debido a que la mayor parte de las fibras del nervio óptico atraviesan y conectan con el lóbulo óptico contralateral. Esta disposición anatómica permite utilizar el lado ipsilateral como control interno (8,55).

Los experimentos de enucleación, ablación parcial, rotación y trasplante han sido herramientas muy útiles para el estudio del desarrollo del sistema visual de vertebrados (346).

5.5.1.1. Efecto de la enucleación temprana sobre el tectum óptico.

La eliminación de la conexión aferente en una región del SNC permite un estudio detallado de ésta en ausencia de un posible factor morfogenético. De esta forma se puede establecer el momento exacto en que la región en cuestión, depende de la señal y así examinar la fases críticas en las que la formación de una conexión ejerce su efecto primario (397).

Nuestros resultados sobre el efecto de la enucleación temprana de un ojo (el derecho) sobre la actividad de AChE en el tectum (Fig. 47) concuerdan con los descritos en la literatura en varios aspectos.

Por una parte observamos una reducción en la cantidad de proteína del tectum desaferentado (T_D) frente al tectum

ipsilateral o control (T_0). Esto ha sido observado también por Kelly y Cowan (397) y Bondy y col. (398). Nuestras observaciones confirman los resultados de estos autores sobre la disminución diferencial de la cantidad de proteína del tectum contralateral al ojo enucleado, que es observable incluso morfológicamente a partir del nacimiento. Esta pérdida de volumen se atribuye a un elevado grado de muerte celular por atrofia o degeneración de neuronas diferenciadas ya que la desaferentación del tectum en el segundo o tercer día del desarrollo embrionario afecta al desarrollo tectal a partir de la fecha en que se hubiera establecido el contacto retinotectal. Los efectos de la enucleación pueden ser menos dramáticos si ésta se llevaba a cabo en periodos más avanzados del desarrollo (25,397).

Hay que destacar en la Fig. 47 que la cantidad de proteína es inferior en el tectum desaferentado frente al tectum control, y a su vez en el tectum derecho (control interno del pollo enucleado) se observa una pequeña reducción en la cantidad de proteína frente a la de pollos normales pertenecientes al mismo lote. Ello puede tener relación con el fallo de parte de la sinapsis entre ambos lóbulos tectales, que producirían alteraciones secundarias en el lóbulo que recibe la conexión visual. También puede deberse este efecto sin embargo, a problemas de nutrición y desarrollo general por una menor capacidad funcional, con incidencia en la alimentación.

En la Fig. 47 se ve que el efecto de la enucleación sobre la actividad específica de la AChE es prácticamente nulo, mientras que el efecto sobre la actividad

acetilcolinesterasica total se limita a reproducir lógicamente los valores obtenidos de cantidad de proteína.

La actividad del enzima colinérgico ChAT muestra un patrón de desarrollo muy semejante al de la AChE (Fig. 51) con una disminución no tan constante de la razón T_1/T_0 a lo largo del desarrollo (Fig. 52) mientras que la actividad específica no se ve afectada por la enucleación al igual ocurría con la actividad AChE. Este paralelismo entre las dos actividades enzimáticas ha sido descrito por Henke y Fonum en la paloma, en la que se observa una reducción enzimática tras cuatro semanas de enucleación. Estos autores concluyen que la AChE es un buen marcador colinérgico en el tectum de estas aves (354).

Los datos obtenidos en nuestros experimentos concuerdan con los de otros autores (399) y parecen indicar que si las fibras de la retina no llegan al tectum (como ocurre en pollos a los que se les extirpa la vesícula óptica) no se observan variaciones notables en la actividad específica de los enzimas colinérgicos. La reducción de la actividad total de estos enzimas en el tectum desafeerentado ocurre solamente cuando los centros ópticos muestran atrofia. Esto sugiere que la actividad global de estos enzimas en el cuerpo celular es en general, independiente de la conexión retinotectal y puede estar relacionada con otras funciones neuronales. También pudieran influir en los resultados la conservación de fibras nerviosas que van de la retina al tectum ipsilateral ya que en pollos enucleados no se produciría la degeneración de estas fibras (55,59).

5.5.1.2. Interacciones celulares en cultivos de coagregados de

retina y tectum.

El sistema auxiliar de cultivos de agregación celular nos permite estudiar la autonomía relativa y/o dependencia mutua del tectum y la retina durante el desarrollo del sistema visual. La capacidad de este tipo de cultivos de organizarse tridimensionalmente según los propios requerimientos celulares, en función de posibles mecanismos de reconocimiento específico, y sin dependencia alguna de sustratos artificiales o biológicos, le confiere una especial idoneidad para el estudio de los mecanismos y efectos de las interacciones celulares durante el desarrollo.

Para estudiar la interacción celular de retina y tectum en este contexto hemos comparado los resultados obtenidos en los coagregados de retina y tectum con los valores correspondientes a cada uno de estos tejidos cultivados aisladamente.

Los resultados que se muestran (Fig. 53) indican que los parámetros generales, proteína y DNA, muestran una mejor preservación cuantitativa en el coagregado frente a los cultivos aislados (Fig. 54). Esto muestra claramente que la interacción retinotectal ejerce un efecto trófico general sobre la maduración del sistema, lo cual tiene un significado biológico potencialmente importante.

La actividad de los enzimas colinérgicos también refleja el efecto positivo de la interacción. Este sinergismo es más evidente en la actividad ChAT y concuerda con los resultados obtenidos por el grupo de Gottlieb utilizando también cultivos sincrónicos (400).

Nuestros resultados confirman que el sistema de

coagregación "in vitro" representa una interesante opción metodológica para el estudio de la interacción entre grupos celulares que van a dar una función general coordinada, como es el caso del sistema visual. Esto ha sido demostrado también por Adler y col. (401). Este sinergismo muestra una dependencia temporal ya que es preciso que las células procedan de embriones de la misma edad (391).

Aumentos de la actividad ChAT similares a los observados en cultivos retinotectales se han observado en células de médula espinal en co-cultivo con células de músculo esquelético (173).

En cuanto a los análisis de distribución de formas moleculares de AChE en los coagregados (Figs. 56 y 57) indican que, como en el caso de tectum desaferentado, la interacción celular no parece producir cambios en la distribución de la AChE entre sus diferentes estructuras y sólo se observan cambios en las actividades globales.

En nuestro sistema de coagregación hemos observado, como ha descrito Kato (257) en cultivos de músculo y ganglio, que la forma A_{12} se expresa casi en igual proporción en los cultivos aislados (Fig. 57) que en el coagregado. La síntesis de las formas moleculares de la AChE en el tectum no sería pues consecuencia de la inervación retiniana sino que aparecerían por la capacidad endógena del tectum de diferenciarse en ese sentido a determinada edad del desarrollo. Este fenómeno ha sido recientemente observado también en la A_{12} del músculo por Toutant y col. (390).

5.5.2. Regulación de la función postnatal temprana por efecto

de la deprivación ocular.

Nuestros experimentos realizados en pollos deprivados de luz al nacer indican que no se observan diferencias remarcables entre el tectum y la retina ya que la relación entre ambos tejidos es muy próxima a 1. Jerusalinsky y de Robertis (401) han observado una reducción en la actividad total de AChE del tectum contralateral al ojo deprivado y también en el receptor muscarínico de la ACh y apuntan al hecho de que esta reducción transitoria y las actividades en ambos tecta se equilibran en el 89 día postembrionario. En cualquier caso las diferencias observadas son muy pequeñas como podemos ver también por nuestros resultados.

5.5.3. Adición de drogas colinérgicas durante el desarrollo embrionario temprano.

La estrecha relación existente entre la actividad AChE y los receptores para ACh a nivel sináptico sugirió la posibilidad de explorar los posibles efectos del bloqueo de los receptores (muscarínicos principalmente) en el desarrollo de la AChE.

Se ha descrito por ejemplo un desarrollo paralelo de los receptores muscarínicos de ACh y la actividad ChAT en bulbo olfatorio de rata (360). Nuestros experimentos realizados con atropina son un primer ejemplo de un estudio a más largo plazo, que intenta ver la correlación entre las actividades de los enzimas colinérgicos y el receptor a lo largo del desarrollo. Se puede observar (Tabla X) que la atropina produce una reducción de actividad AChE que afecta a las formas globulares, ya que la proporción de A_{12} sintetizada no

varia (incluso aumenta) en presencia de atropina 500 mM, produciéndose una reducción muy pequeña de la actividad total de esta forma.

Esto confirma la relación existente entre el desarrollo de la AChE y el estado fisiológico del receptor de ACh. Russell y col. (403) han comprobado un efecto inverso inhibiendo la AChE con DFPP, lo que produce un aumento de la ACh libre que parece conducir a una reducción en los niveles de receptores muscarínicos.

Los experimentos que se exponen en este trabajo indican que el sistema retinotectal es un sistema de estudio válido para ver la distribución molecular de la AChE durante el desarrollo, incluyendo su regulación. Estudios futuros sobre la síntesis y externalización del enzima pueden darnos mucha información sobre los interrogantes que se plantean en este trabajo. Resulta interesante también proseguir con los estudios en el músculo esquelético tanto "in vivo" como en cultivo, pues nos ofrecen la posibilidad de analizar por separado las dos clases de formas asimétricas que hemos descrito.

6. CONCLUSIONS.

19. El sistema retinotectal del pollo es un sistema válido para estudios de desarrollo de neurotransmisión colinérgica, teniendo en cuenta la presencia y actividad significativa de los enzimas de síntesis (colina acetiltransferasa) y de degradación de la acetilcolina (acetilcolinesterasa), y la evolución característica y reproducible que presentan éstos a lo largo del periodo de desarrollo embrionario y postnatal considerado.

20. El periodo de desarrollo utilizado en este estudio es una etapa de diferenciación como se observa por la estabilidad de la cantidad de DNA, el aumento de la proteína total, la relación proteína/DNA y por la evolución de los parámetros colinérgicos.

39. El perfil característico de la acetilcolinesterasa, así como las diferencias de distribución entre sus formas moleculares indican que la síntesis de esta enzima está regulada por el proceso de desarrollo. Esto no es suficiente sin embargo, para asignarle un papel de marcador de inervación colinérgica.

49. El sistema de cultivos histotípicos de agregados de células embrionarias, es una herramienta muy útil para el análisis de las relaciones existentes entre los acontecimientos bioquímicos y morfológicos durante la maduración del sistema nervioso. Esto lo

prueban los perfiles obtenidos de desarrollo de acetilcolinesterasa, colina acetiltransferasa, el porcentaje de colinesterasa verdadera y la expresión de todas las formas moleculares de la acetilcolinesterasa en cultivo.

59. Los estudios realizados en retina, tectum, músculo esquelético de pollo y en el sistema nervioso central de otras especies de vertebrados, indican la existencia de dos clases de formas asimétricas: la clase I extraíble en medios de alta fuerza iónica y la clase II que necesita además un agente quelante para su solubilización. Nosotros podemos concluir, que en el sistema retinotectal del pollo la práctica totalidad de las formas asimétricas pertenecen a la clase II; siendo el EDTA, junto con alta concentración de sal requerimientos indispensables para su solubilización. Además, estas formas presentan la particularidad de agregar en presencia de calcio.

60. En la retina, la proporción relativa de formas A aumenta a lo largo del desarrollo de manera monótona, alcanzando un máximo de cerca de un 10% en el pollo adulto. En el tectum óptico, en cambio, esta forma no supera el 3% e incluso presenta valores inferiores en el pollo adulto. Esta notable diferencia en la evolución postnatal de estas formas, en ambas estructuras, no invalida la hipótesis de la posible

participación específica de la acetilcolinesterasa asimétrica en la función sináptica, pero sugiere una diferencia funcional importante entre las sinapsis colinérgicas retinianas y tectales.

clase II sobre las de la clase I, tras el nacimiento, en el músculo de la extremidad inferior del pollo sugiere un mayor requerimiento fisiológico de estas formas para los procesos de locomoción que se inician con la eclosión.

89. Hemos observado la existencia de dos tipos de formas globulares en el sistema retinotectal del pollo que presentan diferencias en cuanto a la necesidad de detergente para su extracción. En la retina y el tectum, al avanzar en el desarrollo, se observa un predominio de las formas globulares solubles en medios con detergente frente a las formas solubles en medios acuosos con baja concentración salina. Este hecho ha sido correlacionado con el aumento de la cantidad de membrana subsiguiente a la producción y crecimiento de axones y dendritas.

90. Todas las formas moleculares de acetilcolinesterasa caracterizadas en la retina, el tectum (y músculo), tanto asimétricas como globulares (y dentro de éstas últimas tanto solubles en medios acuosos, como en detergente) presentan un perfil de desarrollo característico y reproducible, con notables diferencias entre las diversas formas. Ello supone una invalidación de los estudios sobre desarrollo de tejidos nerviosos y musculares que pretenden correlacionar la actividad global de la

acetilcolinesterasa (es decir la de todas sus formas a la vez) con determinados fenómenos celulares.

109. La desafrentación tectal produce una reducción de las actividades de acetilcolinesterasa y colina acetiltransferasa totales, que refleja solamente la disminución de la cantidad de proteína en el lado afectado, con conservación de la actividad específica. Tampoco hay alteraciones en la distribución de formas estructurales de ~~la~~ acetilcolinesterasa. Esto parece indicar que la síntesis de las formas moleculares del enzima en el tectum no está regulada por la inervación retiniana, sino que se debe a la capacidad genética autónoma del tectum para expresar una determinada población de formas del enzima en determinado momento del desarrollo.

119. Las interacciones celulares retinotectales en cultivos de coagregados revelan un efecto sinérgico a nivel de maduración celular global, también en la actividad específica de la colina acetiltransferasa. Este efecto sinérgico en cuanto a la actividad específica de la colina acetiltransferasa no parece corresponderse con los resultados de los experimentos de desafrentación y pueden deberse a un simple efecto de rescate trófico del tectum que es el tejido que sufre un menor desarrollo aislado en cultivo. Los cambios en la actividad de la acetilcolinesterasa son inconsistentes y se adscribirían probablemente a un efecto trófico no específico. Tampoco hay efecto sobre la distribución de formas moleculares.

129. Las formas asimétricas de la acetilcolinesterasa en el sistema retinotectal del pollo no se ven afectadas durante el desarrollo ni por las interacciones celulares entre estos dos tejidos, ni por la función visual temprana, ni por acción de antagonistas colinérgicos del receptor muscarínico. Estos resultados relativos no permiten confirmar ni descartar la posible participación de dichas formas asimétricas en funciones sinápticas colinérgicas.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1.-J.R. Cooper, F.E. Bloom y R.H. Roth (1982). En "The Biochemical Basis of Neuropharmacology". (4ª Ed), pag 77-108 Oxford University Press, New York.
- 2.-J. Cooke y J.A. Webber (1983). Nature 306, 423-424.
- 3.-G.M. Shepherd (1983). En "Neurobiology". Oxford University Press, New York, 169-183.
- 4.-J.A. Benjamin y G.K. Mckhann (1981). En "Basic Neurochemistry". 3ª Ed. por G.J. Siegel, R.W. Albers, B.W. Agranoff y Katzman pag 445-469.
- 5.-B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raf, K. Roberts, J.D. Watson (1983). En "Molecular Biology of the Cell". 813-890. 1013-1098 Ed. por Garland Publishing Inc. New York.
- 6.-E.G. Jones y W.M. Cowan. In "The structural basis of Neurobiology". (1983). Ed. por E.G. Jones Elsevier Science Publishing Co. New York. 282-370.
- 7.-P. Karfunkel (1974). Int. Rev. Cytol 38, 245-271.
- 8.-W.M. Cowan (1981). "Studies in Developmental Neurobiology". Oxford University Press, New York.
- 9.-C. Prada y G. Ramirez (1983). "Ramón y Cajal's contribution of the Neurociencias". Ed. por Grisolia, Guerri, Samson, Norton y Reinoso-Suárez. Elsevier Science Publishers 117-123.
- 10.-U.S. Caviness y P. Rakic (1978). Annu. Rev. Neurosci.1, 297-326.
- 11.-P. Rakic (1981). Trends Neurosci.4, 184-187.
- 12.-D.G. Jones (1983). Advances in cellular Neurobiology vol. 4, 163-222.
- 13.-J.F. Gadsisseux y P. Evrard (1985). Dev. Neurosci. 7, 12-32.
- 14.- M.J. Bastiani y C.G. Goodman (1984). Proc. Natl. Acad. Sci.

- USA 81-6, 1849-1853.
- 15.-F. Solomon (1984). Trends in Neurosci. 17-20.
- 16.-R.N. Johnston, N.K. Wessells (1980). Curr. Top. Dev. Biol. 16, 165-206.
- 17.-R.W. Sperry (1963). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 703-710.
- 18.-S. Hoffman y G.M. Edelman (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86-18, 5762-5766.
- 19.-G.M. Edelman (1984). Trends in Neurosci. March 78-79.
- 20.-G.M. Edelman, S. Hoffman, C.M. Chuong, J.P. Thiery, R. Brackenbury, W.J. Galli, M. Grumet, M.E. Greenberg, J.J. Hemperly, C. Cohen y B.A. Cunningham (1983). En "Molecular Neurobiology". Simposia of Quantitative Biology Cold. Spring Harbor vol. XLVIII 15-526.
- 21.-U. Rutismanser, W.E. Galli, G.M. Edelman (1978). J. Cell Biol. 79, 382-393.
- 22.-R. Hammerschlag (1984). Dev. Neurosci. 6, 2-17.
- 23.-C. Goridis, H. Deagostini-Bazin, M. Hirnin, M.R. Hirsch, G. Rougon, R. Sadoul, D.K. Langley, G. Gombos y J. Finne (1983). En "Molecular Neurobiology" Simposia of Quantitative Biology Cold. Spring Harbor vol XLVIII 527-532.
- 24.-P.A. Lawrence (1985). Cell 40,221,1.
- 25.-M. Jacobson (1978). "En Developmental Neurobiology". Ed. por Plenum Press. New York. 202-218.
- 26.-H. Thoenen y D. Edgar (1985). Science 229, 238-242.
- 27.-J.R. Sanes (1983). Annu. Rev. Physiol. 45, 581-600.
- 28.-D.A. Aquino, R.U. Margolis y R.K. Margolis (1984). J. Cell Biol. 99, 1130-1139.
- 29.-J.R. Sanes y A.Y. Chiu (1983). En "Molecular Neurobiology". Simposia of Quantitative Biology. Cold Spring Harbor vol.

- XLVIII 667-678.
- 30.-M.V.L. Bennett, D.C. Spray y A.L. Harris (1981). Trends in Neurosci. July 159-163.
- 31.-J.R. Neering y R.N. McBurney (1984). Nature 309, 158-160.
- 32.-V. Hamburger (1970). En "The Neurosciences. Second study program". Ed. por F.O. Schmitt The Rockefeller University Press. New York. p. 141-142.
- 33.-P.G.H. Clarke (1985). Trends in Neurosci. August 345-349.
- 34.-C.J. Barnstable (1982). En "Molecular Genetic Neuroscience". Ed. por F.O. Schmitt, S.J. Bird y F.E. Bloom, Raven Press. New York. 137-138.
- 35.-S.W. Kuffler y J.G. Nicholls (1982). En "De la Neurona al Cerebro". Ed. Reverté.
- 36.-C. Koch, T. Poggio y V. Torre (1986). Trends in Neurosci. May 204-205.
- 37.-R.W. Rodieck (1973). En "The vertebrate retina Principles of structure y Function". Ed. por W.H. Freeman y Company 1-10.
- 38.-L.J. Fisher (1982). En "Cellular communication during ocular development". Ed. por J.B. Sheffield y S. R. Helfer. Springer Verlag. New York. 15-19.
- 39.-P. Schilder, T. Pasik y P. Pasik (1971). Brain Res. 32, 383-385.
- 40.-M.C. Bushnell, M.E. Goldberg y D. Lee Robinson (1981). J. Neurophysiol. 46-4, 755-772.
- 41.-S. Murray Sherman (1985). Trends in Neurosci. Augst 350-355.
- 42.-M. Klieb y C.J. Shatz (1985). J. Neurosci. 5-10, 2661-2653.
- 43.-S. Ramón y Cajal (1889). Anat. Anz 4, 111-121.
- 44.-W.R. Levick y D.R. Dvorak (1986). Trends in Neurosci. 9-5. May 181-183.

- 45.-S. Ramón y Cajal (1891). *J. Intern. Anat. Physiol.* 8, 337-366.
- 46.-A.R. Gardner-Medwin (1984). *Nature* 309, 113-115.
- 47.-E.A. Newman (1984). *Nature* 309, 155-157.
- 48.-D.I. de Pomerai B. Kotecha, M. Florhenry, C. Fullick, A. Young y N.A.H. Galí (1983). *Embriol. Exp. Morph.* 77, 201-220.
- 49.-S.C. Sharma (1982). En "Cellular Communications during ocular development". Ed. por J.R. Sheffield y S. R. Helfer. Springer Verlag. New York. 1-13.
- 50.-K. Lam, A. Jervie Sefto y M.R. Bennett (1982). *Developmental Brain Res.* 3, 487-491.
- 51.-M. Jacobson (1968). *Develop. Biol.* 17, 202-218.
- 52.-J.F. Schmidt (1982). *Trends in Neurosci.* April 111-115.
- 53.-J.T. Schmidt (1984). *Trends in Neurosci.* October 358-360.
- 54.-F. Bonhoeffer y A. Gierer (1984). *Trends in Neurosci.* October 378-381.
- 55.-S.C. McLoon y R.D. Lund (1980). *Exp. Brain Res.* 40, 273-282.
- 56.-B. Schlosshauer, U. Schwarz y U. Rutishauser (1984). *Nature* 310, 141-143.
- 57.-E.R. Kandel (1985). En "Principles of Neural Science". Ed. por E.R. Kandel y J.H. Schwartz. Elsevier Science Publisher. New York. 743-755.
- 58.-R.B. Marchase (1977). *J. Cell Biol.* 75, 237-257.
- 59.-S.C. McLoon (1985). *J. Neurosci.* 5-10, 2570-2580.
- 60.-P. Panzetta, A.P. Chiarenza y H.J.F. Machioni (1983). *Int. J. Develop. Neuroscience* 1-2, 149-153.
- 61.-R.F. Dacheux (1982). En "Cellular Communications during ocular development". Ed. por J.R. Sheffield y S.R. Helfer Springer Verlag. New York. 30-45.
- 62.-S.C. Sharma (1981). En "Studies in Developmental

- Neurobiology". Ed. por M. Cowan, Oxford University Press. New York. 218-230.
- 63.-R. Fearson (1972). En "The Avian Brain". Academic Press. London. 78-126, 327-337.
- 64.-R.C. Merrell (1980). En "Proteins of the Nervous System". Ed. por R.A. Bradshaw y D.M. Schneider. Raven Press. New York.
- 65.-S.C. McLoon (1982). Science 215, 1418-1419.
- 66.-W. Hodos, K.A. Macko y D. Isommers (1982). Behavioural Brain Res. 5, 157-173.
- 67.-S.C. McLoon y R.D. Lund (1982). Exp. Brain Res. 45, 277-284.
- 68.-L.S. Jen y R.D. Lund (1981). Brain Res. 211, 37-37.
- 69.-W.F. Hugnes, S.C. McLoon (1979). Exp. Neural. 66, 587-561.
- 70.-R.H. Masland y M. Tauchi (1986). Trends in Neurosci.(1986). May 218-223.
- 71.-H. Henke, T.M. Schenke y M. Cuenod (1976). J. Neurochem. 26, 125-130.
- 72.-S.C. Bondy y J.L. Purdy (1977). Brain Res. 119, 417-426.
- 73.-R. Bauchman (1982). En "Cell Communcation During Ocular development". Ed por J.B. Scheffield y S.R. Halfer. Springer Verlag. New York. 31-46.
- 74.-P. Bagnoli, A. Burkhalter, A. Vischer, H. Henke y M. Cuenod (1982). Brain Res. 247, 289-302.
- 75.-E. Marder (1984). Trends Neurosci. February 48-53.
- 76.-A. Peters (1984). Trends in Neurosci. October 375-378.
- 77.-J.E. Dowling (1986). Trends in Neurosci. May 236-240.
- 78.-O. Loewi (1921). Pflügers Arch. ges. Physiol. 189, 239-242.
- 79.-O. Loewi y E. Navratil (1926). Pflügers Arch. ges. Physiol. 214, 678-688.
- 80.-H.H. Dale y H.W. Dudley (1924). J. Physiol. 68, 97-123.

- 81.-H.H. Dale, W. Feldberg y M. Vogt (1936). J. Physiol. 86, 353-380.
- 82.-J.C. Eccles, P. Fatt y K. Koketsu (1954). J. Physiol. 126, 524,530.
- 83.-J. Dodp, R. Dingledine y J.S. Kelly (1981). Brain Res. 207, 109-112.
- 84.-L.M. Nowak y R.L. MacDonald (1983). Neurophysiol. 49, 792-795.
- 85.-A.E. Cole y R.A. Nicoll (1983). Science. September 221, 1299-1304.
- 86.-B. Katz (1969). En "The release of Neural Transmitter Substances".Ed por Liverpool University Press.
- 87.-B. Katz y R. Miledi (1972). J. Physiol. 224, 665-699.
- 88.-B. Katz (1966). En "Nerve, Muscle y Synapso" McGraw Hill. New York.
- 89.-Z.W. Hall, J.G. Hildebrand y E.A. Kravitz (1984). En "Chemistry of Sinaptic Transmission". Chiron Press. New York.
- 90.-K. Krnjevic (1974). Physiol. Rev. 54, 419-540.
- 91.-E.F. Barrett y K.L. Maglepor (1976). En "Biology of Cholinergic Function". Ed por A.M. Goldberg y I. Hanin Raven Press, New York. 29-100.
- 92.-C.F. Stevens (1979). Sci. Am. 241-3, 54-65.
- 93.-D.O. Carpenter y T.S. Reese (1981). En "Basic Neurochemistry". Ed por S.J. Siegel et al. Little, Brow y Company Boston pp 161-181.
- 94.-B. Katz y R. Miledi (1969). J. Physiol. 203, 459-487.
- 95.-B. Katz y R. Miledi (1970). J. Physiol. 207, 789-801.
- 96.-J. del Castillo y B. Katz (1957). En "Microphysiologie comparée des Elements Excitables". Paris Centre Natl. Res. Sci. Colloq. Int. vol 67, pp 245-258.

- 97.-F.C. MacIntosh (1980). En "Synaptic constituents in Health y Disease". Ed por M. Arzin et al. Pergamon Press, Oxford 11-50.
- 98.-D.C. Anderson, S.C. King y S.M. Parsons (1983). Mol Pharmacology 24, 48-54.
- 99.-L. Tauc (1982). Physiol. Rev. 62-3, 857-893.
- 100.-R.N. Marchbanks (1978). Trends Neurosci.1, 83-84.
- 101.-M. Israel, B. Lesbats, N. Morel, R. Manaranche, I Culik-Krzywicki y J.C. Dedieu (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 277-281.
- 102.-J. Crossland y K.Z. Ahmed (1984). Neurochem. Res. 9-3.
- 103.-S. Luz, I. Pinchas y D.M. Michaelson (1985). J. Neurochem. 45, 43-50.
- 104.-J.E. Heuser, T.E. Reese, M.J. Dennis, Y. Jan, L. Jan y L. Evans (1979). J. Cell. Biol. 81, 275-300.
- 105.-R.A. Bradshaw y D.M. Scheneider (1986). En "Protein of the Nervous System". Ed. por Raven Press, New York. 232-257.
- 106.-D.M. Michaelson y M. Burstein (1985). FEBS Lett.188-2, 389-393.
- 107.-M. Israel, J. Gaufron y B. Lesbats (1970). 17, 1441-1450.
- 108.-S.D. Eulkar y A. Fine (1979). Rev. Neurosci. 4, 179-232.
- 109.-C.F. Stevens (1976). Cold. Spring Harbord Symp. Quant. Biol. 40, 169-174.
- 110.-M.A. Raftery, M.W. Hunkapiller, C.D. Strader, I.E. Hood (1980). Science 208, 1454-1457.
- 111.-P.E. Potter, M. Habjiconstantinou, J. L. Meeka y N. H. Neff (1984). J. Neurochem. 43, 288-290.
- 112.-R. Rogart (1981). Annu. Rev. Phisiol. 43, 711-725.
- 113.-R. Rahamimoff, S.D. Erulkar, E. Alnaes, H. Meiri, S.

- Rotshenker y H. Rahamimoff (1976). Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 40, 107-116.
- 114.-R.C. Thomas (1972). *Physiol. Rev.* 42, 563-594.
- 115.-R. Collier y H.S. Katz (1974). *J. Physiol.* 238, 639-655.
- 116.-R. Werman (1966). *Biochem. Physiol.* 18, 745-766.
- 117.-J.W. Phillis (1970). En "The Pharmacology of Synapses". Pergamon Press. New York. 33-35.
- 118.-B.H. Wainer, A.I. Levey, E.J. Mufson y M.M. Mesulam (1984). *Neurochem. Int.* 6-2, 163-182.
- 119.-M.J. Kuhar y S.F. Atweh (1978). *Rev. Neurosci.* 3, 35-76.
- 120.-H.C. Fibiger (1982). *Brain Res. Rev.* 4, 327-388.
- 121.-M.J. Kuhar (1976). En "Biology of Cholinergic Function". A.M. Goldber y I Hams eds. Raven Press. New York. 3-27.
- 122.-P.R. Lewis y D.P. Knight (1977). En "Practical Methods in Electron microscopy" Ed. por Glauert vol. 5 1-34.
- 123.-F.C. MacIntosh (1981). En "Basic Neurochemistry". Ed. por G.T. Siegel et al. Little Brown and Company, Boston. 183-204.
- 124.-P. Pauling (1974). En "Cholinergics Mechanisms". Ed. por P.G. Wasse Raven Press. New York. 241-247.
- 125.-J.P. Green, C.L. Johnson y S. Kang (1974). *Annu. Rev. Pharmacol.* 14, 314-342.
- 126.-J. Lindstrom (1985). En "Neurotransmitter Receptor Binding". Ed. por M.J. Yamamura, J. Enna y M.J. Kuhar. Raven Press. New York. 123-137.
- 127.-R.J. Leonard, S. Nakajima, Y. Nakajima y T. Takamashi (1984). *Science*. October 220, 55-57.
- 128.-J. Verdenhalven, G. Bandini y F. Macho (1982). *FEBS Lett.* 147-2, 168-170.
- 129.-R.M. Conti-Tronconi y N.A. Rattery (1982). *Annu Rev. Biochem.*

- 51, 491-530.
- 130.-V. Witzemann (1983). En "Basic Aspects of Receptor Biochemistry". Journal of Neural Transmission suppl. 18 Ed. por M. Goldstein et al. Springer Verlag. New York.
- 131.-J.L. Marx (1983). Science. March 219, 1055-1056.
- 132.-B. Molton, S.J. Tzartos, J.P. Changeux (1984). Int. J. Devl. Neuroscience 2-4, 549-555.
- 133.-M. Mihovilovic y D.P. Richman (1984). J. Biol. Chem. 259-24, 15051-15059.
- 134.-B.M. Conti-Tronconi, M.A. Raftery (1983). Advances in Cell Neurobiol. 4, 105-120.
- 135.-B. Csillik (1975). En "International Review of Neurobiology". vol 18 69-134.
- 136.-D. Donnelly, M. Mihovilovi, J.M. Gonzalez-Ros, J.A. Ferragut, D. Richman y M. Martinez-Carrion (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7999-8003.
- 137.-S.G. Cull-Candy, R. Miledi y A. Trautmann (1978). Nature, January 271, 74-75.
- 138.-H.W. Chang y E. Bock (1977). Biochemistry 16, 4413-4520.
- 139.-J. Cartaud, J.L. Popot y J.P. Changeux (1980). FEBS Lett 121, 327-332.
- 140.-D. Wise, R.P. Schoenborn y A. Kaplin (1981). J. Biol. Chem. 256, 4124-4126.
- 141.-D. Fambrough (1979). Physiol. Rev. 59, 165-227.
- 142.-C. Kalcheim, D. Duksin y Z. Vogel (1982). J. Biol. Chem. 257-21, 12722, 12727.
- 143.-G.D. Fisbach (1972). Dev. Biol. 28, 407-419.
- 144.-P.P. Rowel y D.L. Winkler (1984). J. Neurochem. 43, 1593-1598.
- 145.-W.C.S. Wu y M.A. Raftery (1981). Biochemistry 20, 694-701.

- 146.-R. Sakmann, J. Patlak, E. Neher (1980). *Nature* 286, 71-73.
- 147.-R. Sakman, C. Methfessel, M. Mishina, T. Takahashi, T. Takai, M. Kurasaki, K. Fukuda y S. Numa (1985). *Nature* 318, 538-543.
- 148.-K.A. Frey, R.D. Hichwa, R.L. Ehrenkauffer y B.W. Agranoff (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6711, 6715.
- 149.-K. Haga y T. Haga (1985). *J. Biol. Chem.* 260-13, 7927-7935.
- 150.-J.J. Rauh, M.P. Lampert, N.J. Cho, H. Chin y W.L. Klein (1986). *J. Neurochem.* 46, 23-32.
- 151.-W.C. Liles y N.M. Nathanson (1986). *J. Neurochem.* 46, 89-95.
- 152.-E.P. Kouvelas, L.A. Greene (1982). *Dev. Neurosci.* 5, 375-378.
- 153.-J. Mallol, M.C. Sarraga, M. Bartolomé, M.S. Ghandour y G. Gombos (1984). *J. Neurochem.* 42, 1641-1649.
- 154.-G.D. Pappas, D.P. Purpura (1972). En "Structure and Function of Synapses". Raven Press, New York.
- 155.-N.M. Nathanson (1982). *Trends Neurosci.* November 401-404.
- 156.-R.J.H. Wojcikiewicz, P.R.M. Dobson, B.L. Brown (1984). *Biochim Biophys. Acta* 805, 25-29.
- 157.-H.C. Hartzell (1981). *Nature* 291, 539-544.
- 158.-D.M. Michaelson, S. Avissar, Y. Kloog y M. Sokolovsky (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6336-6340.
- 159.-J. Kehoe, A. Marty (1980). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 9, 437-465.
- 160.-J.C. Szerb (1978). En "Cholinergic Mechanisms and Psychopharmacology". Ed. por Plenum Press, New York, 49-60.
- 161.-D. Nachmansohn y A.L. Machado (1943). *J. Neurophysiol* 6, 397-403.
- 162.-E.T. Browning (1976). En "Biology of Cholinergic Function". Ed. por A.M. Goldberg y I. Hanins Raven Press, New York 187-201.

- 163.-C.G. Benishin y P.T. Carroll (1983). *J. Neurochem.* 41, 1030-1039.
- 164.-L.R. Hersh (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 12820-12834.
- 165.-J.K. Blusztajn y R.I. Wurtman (1983). *Science* 221, 614-620.
- 166.-J.B.G. Ghajar, G.E. Gibson y T.E. Duffy (1985). *J. Neurochem.* 44, 94-98.
- 167.-S. Tucek (1985). *J. Neurochem.* 44-1, 11-24.
- 168.-C.R. Gundersen, D.J. Jenden y R. Miledi (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 603-611.
- 169.-T. Kato y Y.L. Murashima (1985). *J. Neurochem.* 49, 675-679.
- 170.-J. Schuberth (1966). *Biochim. Biophys. Acta* 122, 470-481.
- 171.-G. Bruce, B.H. Wainer y L.R. Hersh (1985). *J. Neurochem.* 45, 611-620.
- 172.-J.H. Schwartz (1979). *Annu. Rev. Neurosci.* 2, 467-504.
- 173.-I. Ishida y T. Deguchi (1984). *J. Neurochem.* 43, 42-48.
- 174.-F. Fonum (1968). *Biochem. J.* 109, 389-398.
- 175.-C.G. Benishin y P.T. Carroll (1984). *J. Neurochem.* 43, 885-887.
- 176.-L.R. Hersh, B.M. Wainer y L. Andrews (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 1253-1258.
- 177.-J.B. Rand y R.L. Russell (1985). *J. Neurochem.* 44, 189-200.
- 178.-J.R. Slemmon, P.M. Salvaterra y E. Roberts (1984). *Neurochem. Int.* 6-4, 519-525.
- 179.-P. Gómez-Ramos, C. Estrada y C. Pérez-Rico (1985). *J. Neurochem.* 44, 993-995.
- 180.-K. Sandberg, R.L. Schnaar, M. McKinney, J. Hanin, A. Fisher y J.T. Coyle (1985). *J. Neurochem.* 44, 439-445.
- 181.-E.K. Perry y R.M. Perry (1982). *TINS August* 58, 261-262.
- 182.-F.F. Santos-Benito y J.L. González (1985). *J. Neurochem.* 45,

- 633-636.
- 183.-S. Shimohama, T. Taniguchi, M. Fujiwara y M. Kameyama (1986).
J. Neurochem. 46, 288-293.
- 184.-H.C. Martzell, S.W. Kuffler y D. Yoshikami (1975). J. Physiol.
251, 427-463.
- 185.-H.H. Dale (1914). J. Pharmacol. Exp. Ther. 6, 147-190.
- 186.-A. Marnay y D. Nachmansohn (1937). J. Physiol. 89, 359-367.
- 187.-B. Mendel y H. Rudney (1943). Biochem. J. 37, 59-63.
- 188.-T.L. Rosenberry (1975). Advances in Enzymology 43, 103-218.
- 189.-A.R. Main (1976). En "Biology of Cholinergic Function". Ed.
por A.M. Goldberg y I. Hanin. Raven Press. New York. 269-353.
- 190.-H. Whittaker (1984). En Methods of Enzymatic Analysis IV. Ed.
por D.W. Hass. Verlag Chemie New York. 52-74.
- 191.-A. Silver (1974). The "Biology of Cholinesterases".
North-Holland. Publishing Company Amsterdam.
- 192.-C.L. Markert. (1975). Isozymes. Academic. Press. 207-220,
315-342, 395-397.
- 193.-G.B. Koelle, K.K. Rickard y G.A. Ruch (1979). Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 76, 6012-1016.
- 194.-H. Vigny, V. Gisiger y J. Massoulié (1978). Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 75, 2588-2592.
- 195.-B. Klinar, L. Kamaric, J. Sketelj y M. Brzin (1985).
Neurochem. Res. 10-6, 797-808.
- 196.- I.W. Chubb, A.J. Hodgson y G.H. White (1980). Neuroscience 5,
2065-2072.
- 197.-S. Geenfield, A. Cheramy, V. Leviel y J. Glowinski (1980).
Nature 284, 355-357.
- 198.-A.M. Graybiel, C.W. Ragsdale Jr. (1982). Nature 299, 439-442.
- 199.-E. Meisami (1984). J. Neurochem. 42, 883-886.

200. J.P. Toutant, J. Massoulié y S. Bon (1985). *J. Neurochem.* 44, 580-592.
- 201.-G.R. Koelle (1963). En "Cholinesterases y Anticholinesterases Agents". Ed. por Springer Verlag, Berlin.
- 202.-P.L. Barton, A.M. Futerman y I. Silman (1985). *Biochem. J.* 231, 237-240.
- 203.-P.G. Layer (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6413-6417.
- 204.-W.A. Koelle (1977). *J. Neurochem.* 28, 307-311.
- 205.-J.W. Chubb, E. Rainieri, G.H. White y A.J. Hodgson (1983). *Neuroscience* 10, 1369-1378.
- 206.-J.W. Chubb, A.J. Hodgson y G.H. White (1980). *Neuroscience* 5, 2065-2072.
- 207.-D. Lockridge (1982). *J. Neurochem.* 39, 106-110.
- 208.-C.C.D. Shute, P.R. Lewis (1963). *Nature* 199, 1160-1164.
- 209.-J. Fourman (1966). *Nature* 209, 812-813.
- 210.-I.B. Wilson, F. Bergmann (1950). *J. Biol. Chem.* 186, 683-692.
- 211.-H. Mullner y H. Sund (1980). *FEBS Lett* 119-2, 283-286.
- 212.-H.C. Froede y I.B. Wilson (1971). En "The Enzymes". Ed. por P.D. Boyer. Academic Press, New York. 87-114.
- 213.-J.P. Changeux (1966). *Mol. Pharmacol.* 2, 369-373.
- 214.-G. Mooser, H. Schulman, D.S. Sigman (1972). *Biochemistry* 11, 1595-1602.
- 215.-D. Nachmansohn y I.B. Wilson (1951). *Advan. Enzymol.* 12, 259-339.
- 216.-H.C. Froede y I.B. Wilson (1984). *J. Biol. Chem.* 259-17, 11010-11013.
- 217.-R.H. Kupka (1967). *Biochemistry* 6, 1183-1190.
- 218.-B. Desiré, G. Blanchet, H. Philibert (1973). *Biochimie* 55, 653-662.

- 219.-K.B. Augustinsson (1986). *Acta Physiol. Scand.* 15-52, 1-182.
- 220.-R.D. O'Brien (1963). *J. Agr. Food Chem.* 11, 163-160.
- 221.-J.E. Purdie (1969). *Biochem. Biophys. Acta* 185, 122-125.
- 222.-D.L. Purich (1983). *Contemporary enzyme kinetics and Mechanism*
Academic Press. London 333-335.
- 223.-T.L. Rosenberry, Y.T. Chen, E. Bock (1974). *Biochemistry* 13,
3068-3074.
- 224.-T.M. Harding, R.W. Wiley, A.W. Kirby (1983). *Science* vol. 221,
1076-1077.
- 225.-E. Heilbronn (1965). *Acta Chem. Scand.* 19, 1333-1337.
- 226.-J.P. Changeuz, T. Podleski y J.C. Meunier (1969). *J. Gen
Physiol.* 54, 225.
- 227.-P. Goossens, J. Viret y F. Leterrier (1984). *Biochem. Biophys.
Res. Commun* 123-1, 71-77.
- 228.-J. Massoulié y F. Rieger (1969). *Eur. J. Biochem.* 11, 441-455.
- 229.-M.A. Grafius y D.B. Millar (1967). *Biochim. Biophys. Acta* 110,
540-545.
- 230.-J. Massoulié, F. Rieger y S. Bon (1971). *Eur. J. Biochem.* 21,
542-551.
- 231.-Y. Dudai y T. Silman (1973). *FEBS Lett* 30, 49-52.
- 232.-F. Rieger, S. Bon, J. Massoulié y J. Caraud (1973). *Eur. J.
Biochem.* 34, 5390547.
- 233.-J. Cartaud, F. Rieger, S. Bon y J. Massoulié (1975). *Brain
Res.* 88, 127-130.
- 235.-G. Guillon y J. Massoulié (1976). 58, 465-471.
- 236.-Y. Dudai, I. Silman, N. Kalderon y S. Blumberg (1972).
Biochim. Biophys. Acta 268, 138-157.
- 237.- W. Leuzinger, M. Goldberg y E. Caudin (1969). *J. Mol Biol.*
40, 217-220.

- 238.-S. Bon y J. Massoulié (1976). FEBS Lett. 67, 99-103.
- 239.-S. Bon, M. Huet, M. Lemonnier, F. Rieger y J. Massoulié (1976). Eur. J. Biochem. 68, 523-530.
- 240.-J. Dudai y J. Silman (1974). J. Neurochem. 23, 1177-1187.
- 241.-T.L. Rosenberry y J.M. Richardson (1977). 16-16, 3550-3558.
- 242.-J. Massoulié (1980). Trends Neurosci. June 160-163.
- 243.-C.D. Johnson, S.P. Smith y R.L. Russell (1977). J. Neurochem. 28, 617-624.
- 244.-L. Anglister y J. Silman (1978). J. Mol. Biol. 125, 293-311.
- 245.-J.S. Lwebuga-Mukasa, S. Lappi y P. Taylor (1976). Biochemistry 15-7, 1425-1433.
- 246.-J. Silman (1976). Trends in Biosci. October 223-227.
- 247.-S. Bon y J. Massoulié (1978). Eur. J. Biochem. 89, 89-99.
- 248.-T.L. Rosenberry, P. Barnett y C. Mave (1980). Neurochem. Intl. 2, 135-148.
- 249.-J. Massoulié, S. Bon y N. Vigny (1980). Neurochem. Intl. 2, 161-184.
- 250.-S. Bon, N. Vigny y J. Massoulié (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2546-2550.
- 251.-J. Massoulié y S. Bon (1982). Annu Rev. Neurosci. 5, 57-106.
- 252.-T.L. Rosenberry y S.A. Bernhard (1971). Biochemistry 10, 4114-4120.
- 253.-F. Rieger, S. Bon, J. Massoulié, J. Cartaud, B. Picard y P. Benda (1976). Eur. J. Biochem. 68, 513-521.
- 254.-S.L. Lee y P. Taylor (1982). J. Biol. Chem. 257, 12292-12301.
- 255.-N. Vigny, J. Koenig y F. Rieger (1976). J. Neurochem. 27, 1347-1353.
- 256.-S. Bon, J. Cartaud y J. Massoulié (1978). Eur. J. Biochem. 85, 1-14.

- 257.-A.C. Kato, A. Vrachliotis, B. Fulpius y Y. Dunant (1980).
Develop. Biol. 76, 222-228.
- 258.-J.Y. Couraud, H.L. Koenig y L. Di Giamberardino (1980). J.
Neurochem. 34, 1209-1218.
- 259.-N.C. Inestrosa, L. Silverstein y Z.W. Hall (1982). Cell 29,
71-79.
- 260.-S.L. Chan, D.Y. Smirachi, H.N. Bhargava, E. Gardner y A.J.
Trevor (1972). J. Neurochem. 2747-2758.
- 261.-J. Grassi, M. Vigny y J. Massoulié (1982). J. Neurochem. 38,
457-469.
- 262.-K. Sorensen, R. Gentinetta y U. Brodbeck (1982). J. Neurochem.
39, 1050-1060.
- 263.-F. Rieger, R. Chetelat, M. Nicolet, L. Kamac y M. Pouillet
(1980). FEBS Lett. 121-1, 169-174.
- 264.-V. Bisiger, M. Vigny, J. Gautron y F. Rieger (1978). J.
Neurochem. 30, 501-516.
- 265.-Z. Rakonczay, G. Vincendon y J.P. Zanetta (1981). J. Neurochem.
37, 662-669.
- 266.-S. Stieger y U. Brodbeck (1983). J. Neurochem. 44, 48-56.
- 267.-T.A. Dutta-Choudhury y T.L. Rosenberry (1984). J. Biol. Chem.
259-9, 5653-5660.
- 268.-S. Stieger, U. Brodbeck, R. Reber y J. Brunner (1984). FEBS
Lett. 168-2, 231-234.
- 269.-A.H. Futerman, R.M. Fiorini, E. Roth, M.G. Low y I. Silman
(1985). Biochem. J. 226, 369-377.
- 270.-P. Landauer, K.P. Ruess y M. Liefländer (1984). J. Neurochem.
53, 797-805.
- 271.-S. Ron y J. Massoulié (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77-8,
4464-4468.

- 272.-J.P. Zanetta, Z. Rakonczay, A. Reeber, P. Kasa y G. Vincendon (1981). *FERS Lett.* 129-2, 293-296.
- 273.-S.L. Lee, S. Heinemann y P. Taylor (1982). *J. Biol. Chem.* 257-20, 12283-12291.
- 274.-K. Gennari y A. Brodbeck (1985). *J. Neurochem.* 44, 697-704.
- 275.-S. Brimijoin y K.P. Mintz (1985). *Biochim. Biophys. Acta* 828, 290-297.
- 276.-B.P. Doctor, S. Camp, M.K. Gentry, S.S. Taylor y P. Taylor (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5767-5771.
- 277.-M. Sakai, H. Saisu y T. Abe (1985). *Eur. J. Biochem.* 153, 497-502.
- 278.-D.I. Marsh y J. Massoulié (1985). *J. Neurochem.* 44, 1602-1604.
- 279.-R.L. Rotundo (1984a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 479-483.
- 280.-R.L. Rotundo (1984b). *J. Biol. Chem.* 259-21, 13186-13194.
- 281.-S.A. Greenfield, A. Cheramy, V. Leviel y J. Glowinski (1980). *Nature* 287, 355-357.
- 282.-A.J. Hodgson y I.W. Chubb (1983). *J. Neurochem.* 41, 654-662.
- 283.-D.J.H. Brock y C. Hayward (1980). *Clin. Chim. Acta* 108, 133-141.
- 284.-I.W. Chubb, E. Ranieri, A.J. Hodgson y G.H. White (1982). *Neurosci. Lett.* 8, 39.
- 285.-S.L. Lee, S.J. Camp y P. Taylor (1982). *J. Biol. Chem.* 257-20, 12302-12309.
- 286.-O.M. Viratelle y S.A. Bernhard (1980). *Biochemistry* 19, 4999-5007.
- 287.-N. Morel y P. Dreyfus (1982). *Neurochem. Intl.* 4-4, 283-288.
- 288.-H.L. Fernández, M.I. Duell y B.W. Festoff (1979). *J. Neurobiol.* 10-5, 441-454.
- 289.-R. Cohen y Y. Barenholz (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 778,

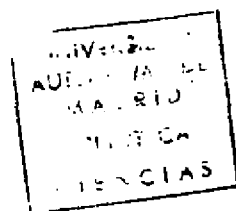
- 94-104.
- 290.-P. Landauer, K.P. Rue6 y M. Liefländer (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 106-3, 848-855.
- 291.-J.C. Torres, M.I. Behrens y N.C. Inestrosa (1983). *Biochem. J.* 215, 201-204.
- 292.-E. Brandan, M. Maldonado, J. Garrido y N.C. Inestrosa (1985). *J. Cell Biol.* 101, 985-992.
- 293.-H.L. Fernández, N.C. Inestrosa y J.P. Stiles (1984). *Neurochem. Res.* 9-9, 1211-1230.
- 294.-S.H. Gaston, R.B. Marchase, E.R. Jakoi (1982). *J. Cell Biol.* 18, 447-459.
- 295.-Z. Rakonczay, J. Mallof, H. Schenk, G. Vincendon y J.P. Zanetta (1981). *Biochim. Biophys Acta* 657, 243-256.
- 296.-L. Di Giambardino, J.Y. Couraud, E.A. Barnard (1979). *Brain Res.* 160, 196-202.
- 297.-J. Koenig y M. Vigny (1978). *Nature* 271, 75-77.
- 298.-J. Koenig y F. Rieger (1981). *Dev. Neurosci.* 4, 269-287.
- 299.-M. Maldonado, B.U. Ramirez, G. Ruiz, J. Yamuy y N.C. Inestrosa (1984). *J. Neurochem.* 43, 375-381.
- 300.-L. Anglister y U.J. McMahan (1985). *J. Cell Biol.* 101, 735-743.
- 301.-H.L. Fernández, M.R. Patterson y M.J. Duell (1980). *J. Neurobiol.* 11, 557-570.
- 302.-M. Nicolet, M. Pincon-Raymond y F. Rieger (1986). *J. Cell Biol.* 102, 762-768.
- 303.-C.M. Cisson y B.W. Wilson (1977). *Biochem. Pharmacol.* 26, 1955-1960.
- 304.-P.A. Dreyfus, F. Rieger y M. Pincon-Raymond (1983). *EO.* 6698-6702.

- 305.-M. Lazar y M. Vigny (1980). *J. Neurochem.* 35, 1067-1079.
- 306.-S.K. Brockman, M.F. Usiak y S.G. Younkin (1986). *J. Biol. Chem.* 261-3, 1201-1207.
- 307.-H. Soreq, D. Zevin-Sonkin, A. Avni, L.M.C. Hall y P. Spierer (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1827-1831.
- 308.-V. Witzemann y C. Boustead (1982). *J. Neurochem.* 39, 747-755.
- 309.-Z. Iqbal y G.P. Talwar (1971). *J. Neurochem.* 18, 1261-1267.
- 310.-P. Taylor, F. Rieger y L.A. Greene (1980). 182, 383-396.
- 311.-W.D. Frenz, T. Tashiro, K. Wächtler, V.P. Whittaker y V. Witzemann (1980). *Neurosci.* 5, 617-624.
- 312.-D.F. Davey y M. W. Cohen (1986). *J. Neurosci.* 6-3, 673-680.
- 313.-N.C. Inestrosa y G. Ruiz (1985). *Dev. Neurosci.* 7, 120-132.
- 314.-L.W. Maynes, M.E. Smith (1982). *Neurosci.* 7-4, 1007-1013.
- 315.-L.W. Wayne, M.E. Smith y D.G. Smyth (1984). *J. Neurochem.* 42, 1542-1551.
- 316.-A. Stalg y A.O. Zupancic (1972). *Nature* 239, 91-92.
- 317.-D. Nachmansohn (1974). En "Central Nervous System Studies of Metabolic Regulation and Function". Ed. por E. Gene Zani y M. Herke, Springer Verlag. Berlin 121-137.
- 318.-J.M. Varela. En "Isozymes II" (1975). Ed. por G.L. Markest 325-342.
- 319.-I.W. Chubb, A.J. Hodgson y G.H. White (1980). *Neurosci.* 5, 2065-2072.
- 320.-I.W. Chubb (1984). En "Cholinesterases. Fundamental and Applied Aspects". Ed. por M. Erzin, T. Kiauta y E.A. Bernard Walter de Gruyter-Berlin 345-354.
- 321.-M. Vigny, L. Di Giamberardino, J.Y. Couraud, F. Rieger y J. Keening (1976). *FEBS Lett.* 69-1, 277-280.
- 322.-R.L. Rotundo y D.M. Fambrough (1979). *J. Biol. Chem.* 259-11,

- 4790-4794.
- 323.-P. Allemand, S. Bon, J. Massoulié y M. Vigny (1981). J. Neurochem. 36-3, 860-867.
- 324.-L.L. Rubin, S.M. Schuetze, C.L. Weill y G.D. Fishbach (1980). Nature 283, 264-267.
- 325.-M.J. Villafruela, A. Barat, E. Manrique, S. Villa y G. Ramirez (1980). FEBS Lett. 110, 91-95.
- 326.-M.J. Villafruela, A. Barat, E. Manrique, S. Villa y G. Ramirez (1981). Develop. Neurosci. 4-1, 25-36.
- 327.-A. Barat, E. Escudero, J. Gómez-Barricócanal y G. Ramirez (1980). Neurosci. Lett. 20, 205-210.
- 328.-A. Barat, E. Escudero, J. Gómez-Barricócanal y G. Ramirez (1980). Biochem. Biophys. Res. Commun. 96-3, 1421-1426.
329. I.B. Levitan, W.E. Mushynski y G. Ramirez (1972). J. Neurochem. 19, 2621-2628.
- 330.-N.N. Osborne En el "9th Meeting of International Society for Neurochemists". Vancouver (1983). J. Neurochem. 41 Supl. S91.
- 331.-G. Ramirez y N.W. Seeds (1977). Develop. Biol. 60, 153-162.
- 332.-N.W. Seeds (1983). Advances in Cell Neurobiol. 4, 57-79.
- 333.-G. Ramirez (1977a). Neurochem. Res. 2, 417-425.
- 334.-G. Ramirez, E. Manrique, A. Barat y S. Villa (1980). En "Tissue Culture in Neurobiology". Ed. por E. Giacobini Raven Press. New York. 129-144.
- 335.-R.G. Martin y B.N. Ames (1961). J. Biol. Chem. 236, 1372-1379.
- 336.-G.L. Ellman, K.D. Courtney, V.L. Andres y R.H. Featherstone (1961). Biochem. Pharmacol. 7, 88-95.
- 337.-A. Blume, F. Gilbert, S. Wilson, J. Farber, R. Rosenberg y H. Nirenberg (1970). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 786-792.

- 338.-K. Wallenfels (1962). *Methods in Enzymology* 5, 21-219.
- 339.-H. Aebi (1974). *Methods of Enzymatic Analysis* 2, 673-684.
- 340.-K. Walter y C. Schütt (1974). *Methods of Enzymatic Analysis* 2, 856-864.
- 341.-O. Lowry, N. Rosenbrough, A. Farr y R. Randall (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 342.-O. Folin, V. Ciocalteu (1927). *J. Biol. Chem.* 73, 627-636.
- 343.-P. Richards (1974). *Anal. Biochem.* 57, 369-373.
- 344.-V. Hamburger (1934). *J. Exp. Zool.* 168, 449-494.
- 345.-N.W. Seeds (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 1858-1861.
- 346.-G. Ramírez (1977b). *Neurochem. Res.* 2, 427-438.
- 347.-A.A. Moscona (1956). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92, 410-413.
- 348.-A.A. Moscona (1961). *Exp. Cell Res* 22, 455-460.
- 349.-I. Silman, J.M. Lyles y E.A. Barnard (1978). *FERS Lett.* 94, 166-170.
- 350.-G. Ramírez, J. Gómez-Barricanal, A. Barat y C. Rodríguez-Borrajo (1984). En "Cholinesterases: Fundamental y Applied Aspects". Ed. por M. Brzin, E.A. Barnard y D. Sket. Walter de Gruyter Co. Berlin.
- 351.-M. Marchi, D.W. Hoffman, E. Giacobini y T. Fredrickson (1980). *Dev. Neurosci.* 3, 235-247.
- 352.-A. Vernadakis y A. Burkhalter (1967). *Nature* 214, 594-595.
- 353.-M. Sorimachi y K. Kataoka (1974). *Brain Res.* 70, 123-130.
- 354.-J. Haywood (1978). *J. Neurochem.* 30, 1195-1197.
- 355.-A. Marchand, G. Chapouthier y J. Massoulié (1977). *FERS Lett.* 78, 233-236.
- 356.-S.C. Shen, P. Greenfield y E.J. Boell (1956). *J. Comp. Neurol.* 106, 433-461.
- 357.-G. Filogamo (1960). *Archs. Biol.* 71, 159-198.

- 358.-G. Rager (1976). *Proc. R. Soc.* 192, 353-370.
- 359.-H. Henke y F. Fonnum (1976). *J. Neurochem.* 27, 387-391.
- 360.-A.M. Burt (1968). *J. Exp. Zool.* 169, 107-112.
- 361.-T.M. Large, M.P. Lamber, M.A. Gremillion y W. L. Klein (1986).
J. Neurochem. 46, 671-680.
- 362.-P.M. Ma y P. Grant (1984). *J. Neurochem.* 42, 1328-1337.
- 363.-J.M. Thompson (1982). *Develop. Brain Res.* 4, 259-264.
- 364.-C.D. Ross, D.D. Dunning, L.J. Juengel y D.A. Godfrey (1985).
J. Neurochem. 44, 1091-1099.
- 365.-J. Sotelo, C.J. Gibbs y D.C. Gajdusek (1984). *Advan. Cell.
Neurobiol.* 5, 251-261.
- 366.-J.R. Sheffield y A.A. Moscona (1970). *Dev. Biol.* 23, 36-61.
- 367.-J.R. Sheffield y D.A. Fishman (1970). *Mikrosk. Anat.* 104,
405-418.
- 368.-M. Fujisawa (1974). *Devel. Growth y Differ.* 16, 191-203.
- 369.-T.S. Okada, K. Nomura y K. Yasuda (1983). *Cell Differ.* 12,
85-92.
- 370.-P. Honnegger y E. Richardson (1976). *Brain. Res.* 109, 335-354.
- 371.-J.K. Marquis y G.D. Webb (1976). *J. Neurochem.* 27, 324-331.
- 372.-E.G. Hollinger y B.M. Niklasson (1973). *J. Neurochem.* 20,
821-836.
- 373.-S.L. Chan, M.A. Gordon y A.I. Trevor (1977). *Life Sci.* 21,
1611-1616.
- 374.-C.A. Reavill, M.S. Wooster y D. T. Plummer (1978). *Biochem. J.*
173, 851-856.
- 375.-K. Kaufmann y J. Silman (1980). *Neurochem. Int.* 2, 205-207.
- 376.-S. Carbonetto (1984). *Trends Neurosci.* October, 382-387.
- 377.-M.R. Emmerling, C.D. John Sen, D.F. Mosher, B.H. Lipton y J.E.
Lilien (1981). *Biochemistry*, 20, 3242-3247.



- 378.-I. Silman, J.M. Lyles y E.A. Barnard (1978). FEBS Lett. 94, 166-170.
- 379.-A. Barat, J. Gómez-Barriocanal y G. Ramírez (1984). Neurochem. Int. 6-3, 403-412.
- 380.-Z.W. Hall (1982). En "Muscle Development. Molecular y Celular Control". Ed. por H.L. Pearson y H.F. Epstein. Cold. Spring Harbor New York. 301-309.
- 391.-P. Ott. (1983). Biochim. Biophys. Acta, 822, 375-392.
- 382.-J.Y. Couraud y L. Di Giamberardino (1980). J. Neurochem. 35, 1053-1066.
- 383.-J.M. Lyles y E.A. Barnard (1980). FEBS Lett. 109, 9-12.
- 384.-F. Rieger, D. Goudou y L.H. Tran (1984). J. Neurochem. 42, 601-606.
- 385.-S.C. Sung y R.A. Ruff (1983). Neurochem. Res. 8-3, 303-311.
- 386.-P.D. Wade y P.S. Timiras (1980). Dev. Neuroci. 3, 101-10.
- 387.-F. Rieger y M. Vigny (1976). J. Neurochem. 27, 121-124.
- 388.-M. Sakai, H. Saisn, N. Koshigoe y T. Abe (1985). Eur. J. Biochem. 189, 197-206.
- 389.-A.H. Futerman, M.G. Lonw, K.E. Ackerman, W.R. Sherman y I. Silman (1985). Biochem. Biophys. Res. Commun. 129-1, 312-317.
- 390.-J.P. Toutant, M. Toutant, M.Y. Fiszman y J.M. Massoulié (1983). Neurochem. Inter. 5-6, 751-762.
- 391.-L.L. Rubin, N.A. Cmalfin, A. Adamo y M.W. Klymkowsky (1985). J. Neurochem. 45, 1932-1940.
- 392.-D. Goudou, M. Verdier-Sahuque y F. Rieger (1985). FEBS. Lett. 186-1, 54-58.
- 393.-N.C. Inestrosa (1984). Biochem. J. 217, 377-381.
- 394.-P.B. Taylor, F. Rieger, M.L. Shelanski y L.A. Greene (1981). J. Biol. Chem. 25, 3827-3830.

- 395.-R.L. Rotundo y D.M. Fambrough (1980). Cell. 22, 583-594.
- 396.-R.M. Alvarado-Mallart y C. Sotelo (1984). 103-378-398.
- 397.-J.P. Kelly y W.M. Cowan (1972). Brain. Res. 42, 263-288.
- 398.-S.C. Bondy, K.C. Bonnet, M.E. Harrington, C.Z. Neurath, R. Nidess, A. Vernadakis, P.R. Vulliet y C. York (1978). Dev. Neurosci. 1, 54-61.
- 399.-P.C. Marchisio (1969). J. Neurochem. 16, 665-671.
- 400.-D.J. Gottlieb, R. Merrel y L. Glaser (1979). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 17, 1800-1802.
- 401.-R. Adler, G. Teitelman y A.M. Suburd (1976). Develop. Biol. 50, 48-57.
- 402.-D.A. Jerusalinsky y E. de Robertis (1984). Develop. Brain Res. 14, 279-283.
- 403.-R.W. Russell, R.A. Booth, D.S. Jenden, M. Roch y K.M. Rice (1985). J. Neurochem. 49, 293-299.

