

TRANSPORTE AXOPLASMICO ORTOGRADO RAPIDO Y RETROGRADO EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE LA NEUROPATHIA DISTAL POR ACRILAMIDA

Dr. JESUS S. MORA PARDINA

Realización SODEGRAF, S. A.
I.S.B.N. 84-300-8160-7
Depósito legal: M. 38.372-1982

TRANSPORTE AXOPLASMICO ORTOGRADO RAPIDO Y RETROGRADO EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE LA NEUROPATHIA DISTAL POR ACRILAMIDA

Dr. JESUS S. MORA PARDINA

INDICE

	Página
Indice	5
ESTADO ACTUAL DEL TEMA	9
Neuropatías periféricas en el hombre	9
Transporte axoplásico	12
Neurotoxicidad de la acrilamida	15
Acrilamida y transporte axoplásico	16
Acetil-colinesterasa y Colín-acetil-transferasa.....	18
MATERIAL Y METODOS	21
Animales y tipo de intoxicación	21
Tiempos de estudio de la intoxicación	21
Técnica utilizada para el estudio del transporte axoplásico	22
Preparación de tejidos y determinación de AChE actividad	23
Determinación de la cantidad de enzima transportado	23
Preparación de tejidos para estudio morfológico	25
Material y reactivos	25
RESULTADOS	27
Patrón de acumulación en ligadura única	27
Transporte ortógrafo en los diferentes estadíos	32
Transporte retrógrafo en los diferentes estadíos	35
Alteraciones morfológicas	37
DISCUSION GENERAL	45
PATOGENESIS DE LA DEGENERACION DISTAL POR ACRI- LAMIDA	53
Similaridad con otras neuropatías	54
BIBLIOGRAFIA	57

El presente trabajo forma parte de un proyecto de investigación más amplio en el que se estudian las posibles alteraciones de los mecanismos de transporte intraneuronal en diversas neuropatías tóxicas y en las enfermedades de la motoneurona, y ha sido realizado en los Neuromuscular Research Laboratories del New England Medical Center, en Boston, USA, bajo la dirección del profesor Walter G. Bradley.

Con motivo de su publicación, deseo expresar mi agradecimiento a la Fundación Ramón Areces, sin cuya generosa colaboración hubiera sido imposible la realización de este trabajo, por su decidido y continuo apoyo al desarrollo de la investigación científica, único camino válido para el progreso social.

Madrid, mayo de 1982.
El autor.

ESTADO ACTUAL DEL TEMA

1. Neuropatías periféricas en el hombre:

Las neuropatías periféricas son uno de los grupos de enfermedades neurológicas debilitantes más frecuentes en el hombre, y sin embargo uno de los menos entendidos.

Los nervios periféricos son frecuentemente dañados en diversas enfermedades sistémicas que incluyen diabetes mellitus, insuficiencia renal con uremia, hepatopatías, síndromes de malabsorción intestinal, deficiencias nutricionales y vitamínicas, enfermedades colágeno-vasculares y neoplasias. Otro grupo de neuropatías periféricas, también muy comunes, son las producidas por ataques directos del propio sistema inmunitario a las fibras nerviosas; de forma aguda o de forma crónica y recurrente. Un tercer grupo de neuropatías son las transmitidas de forma hereditaria, siendo las más comunes la atrofia muscular peroneal y las acropatías úlceromutilantes.

El grupo de las neuropatías infecciosas, y entre ellas la más común la producida por la lepra, constituyen en la actualidad un problema sanitario mundial de primer orden. Son también muy frecuentes las neuropatías de la vejez, de causa desconocida, y las producidas por exposición a sustancias químicas neurotóxicas, de uso industrial y medicamentoso. Este grupo está aumentando considerablemente en los últimos años debido a la proliferación de nuevos compuestos químicos en el mercado, de los cuales no se conoce su posible neurotoxicidad (Bradley, 1981).

Finalmente, en la práctica médica diaria, a pesar de extensas evaluaciones clínicas y de laboratorio, en un 50 por 100 de los casos no es posible establecer la causa de la neuropatía. En estos casos, la sospecha de posible contacto con sustancias neurotóxicas desconocidas es siempre muy grande.

A pesar de su frecuencia, muy poco se conoce de los mecanismos patogénicos de estas enfermedades, y menos de las alteraciones bioquímicas que las provocan. A efectos prácticos de clasificación, las neuropatías periféricas se dividen en axonales y desmielinizantes según la localización inicial de las alteraciones morfológicas en la fibra nerviosa. Así, en las neuropatías axonales, el axón nervioso distrofia y degenera, y se considera que la causa de ellas radica en una lesión de la célula nerviosa.

En las neuropatías desmielinizantes, se considera que la alteración primaria radica en el metabolismo de la célula de Schwann. Sin embargo, degeneración axonal y desmielinización segmentaria coexisten muchas veces y es posible que la íntima relación entre la célula de Schwann y el axón nervioso lleve consigo el que la alteración del contenido axónico provoque una alteración en el metabolismo de la célula de Schwann, y que la disfunción de la célula de Schwann provoque una distrofia de la fibra nerviosa. De igual manera, el agente responsable de la neuropatía puede afectar simultáneamente la neurona y la célula de Schwann (Asbury y Johnson, 1978).

La mayor parte de las neuropatías en el hombre son de tipo axonal, y en éstas las de tipo *dying-back* o distal. En ellas la degeneración de la fibra nerviosa se inicia en su porción distal y avanza de forma centrípeta hacia el soma neuronal. Las fibras primeramente afectadas son las que poseen axones más largos y anchos, esto es, las que recogen la sensibilidad e inervan los músculos intrínsecos de los pies y las manos, y los síntomas de las mismas se inician con déficits sensitivos y debilidad de la parte más distal de las extremidades (Bradley, 1981).

La localización de la alteración bioquímica básica que produce la neuropatía distal es desconocida y existen en la actualidad dos hipótesis que intentan explicar la causa por la que las lesiones se inician en la parte más distal de la célula nerviosa, y avanzan de manera proximal.

En la primera de ellas, sustentada inicialmente por Cavanagh (1964), la alteración bioquímica radicaría en la soma neuronal, en los mecanismos de síntesis de la célula. La neurona tiene unas características morfológicas únicas que la diferencian de cualquier otra célula del organismo. Su soma debe mantener un árbol dendrítico y un axón con un volumen y superficie de membrana miles de veces su tamaño que no poseen mecanismos propios de síntesis proteica. Cualquier alteración en los mecanismos de síntesis de proteínas u otras sustancias que radican en la zona perinuclear de la célula afectará inmediatamente la función y estructura del axón y las dendritas. Según Cavanagh, una alteración de estos mecanismos de síntesis no suficientemente grande para provocar de inmediato la muerte celular, podría ser causante de un déficit metabólico en la célula. Las partes más distales de la misma serían las primeras en sufrir este déficit metabólico y degenerar, y

los axones más anchos y largos, con una mayor demanda metabólica, los primeros afectados. En caso de persistencia de la alteración, otros axones más cortos y delgados se verían afectados, y en los más largos la degeneración de la fibra avanzaría proximalmente.

Estudios morfológicos ultraestructurales del soma neuronal en neuropatías distales experimentales no han sido concluyentes, y fundamentalmente negativos (Lowndes y Baker, 1980). Estudios de incorporación de aminoácidos marcados en los tejidos nerviosos, y su velocidad de utilización, como índice de síntesis proteica han producido resultados a veces contradictorios. Así, una disminución de la síntesis proteica ha sido descrita en la neuropatía por mercurio orgánico, por p-bromo-acetil-urea (Cavanagh y Chen, 1971), y acrilamida (Asbury y cols, 1973), y la síntesis normal ha sido descrita por Hashimoto y Ando (1973) en la acrilamida. Pleasure y cols. (1969) y Bradley y Williams (1973) no encontraron ninguna deficiencia en la incorporación de aminoácidos marcados en diferentes neuropatías tóxicas. La hipótesis del soma neuronal como sitio primario de la lesión en las neuropatías periféricas sigue estando sin demostrar.

Estudios morfológicos realizados por Schaumburg y cols (1974) demostraron que los axones no se distrofian inicialmente en sus terminales, sino en la zona preterminal, inmediatamente antes de ramificarse terminalmente. Estos estudios invalidaron de alguna forma la anterior hipótesis. El defecto en la síntesis proteica pericarial podría producir un déficit distal, pero es más difícil de explicar una lesión inicial en la zona preterminal.

El problema se enfocó en el axón. Su enorme volumen y superficie de membrana en relación con el soma lo predispondría a ser la parte celular que antes se alteraría ante un tóxico o un defecto enzimático. Spencer y Schaumburg (1974) adelantaron la hipótesis del defecto en el sistema de transporte axoplásmico como causa de la degeneración distal. Así, un retraso o bloqueo en el suministro de materiales a las partes distales de la neurona, provocarían un déficit de estos materiales en las zonas donde la actividad metabólica de la célula es supuestamente mayor: en la zona axonal preterminal.

Posteriormente, Spencer y cols (1979) sugirieron que ciertos neurotóxicos pueden bloquear enzimas del ciclo energético necesarios para el transporte axoplásmico y la conducción nerviosa. Su déficit en las zonas axonales preterminales, donde su utilización es mayor, provocarían alteración del transporte axoplásmico en esas zonas y la subsiguiente degeneración distal de la fibra.

Los estudios del transporte axoplásmico en las neuropatías periféricas han sido hasta ahora escasos, y a veces también contradictorios (ver apartados sobre Transporte Axoplásmico e Intoxicación por Acrilamida). La relación

causal entre alteraciones del transporte axoplásmico y degeneración distal del axón permanece indemostrada todavía.

El desconocimiento de los mecanismos patogénicos involucrados en la aparición de las neuropatías periféricas impide el tratamiento curativo de las mismas. Su terapéutica se limita a ser sintomática y rehabilitadora (Bradley, 1981).

2. Transporte axoplásmico

Existen una serie de sistemas intraneuronales involucrados en el transporte de materiales entre el soma celular y las dendritas y axón, que son generalmente diferenciados en base a su dirección de transporte y velocidad. Su contribución a la función fisiológica neuronal y su participación en la patogenia de diferentes enfermedades está empezando a ser conocida.

El sistema de transporte anterógrado rápido (TAR) mueve proteínas, glicoproteínas y lípidos relacionados con la membrana neuronal. Transporta también enzimas relacionados con la transmisión nerviosa, sustancias de pequeño peso molecular y calcio. Su máxima velocidad de transporte en mamíferos es alrededor de 400 mm/día; sin embargo, diferentes velocidades, todas por encima de 250 mm/día, han sido descritas para diferentes nervios y especies de animales. En un determinado nervio la velocidad es constante en todos sus axones, independientemente de su calibre, longitud o grado de mielinización (Grafstein, 1977).

El TAR depende de energía producida localmente a lo largo del axón; es bloqueado por la anoxia y por agentes bloqueantes del metabolismo oxidativo (Ochs, 1974); es sensitivo a la temperatura; su velocidad es independiente de la actividad eléctrica de la célula y permanece inalterado en axones separados del soma neuronal (Grafstein, 1977). El TAR puede ser bloqueado por agentes disruptores de los microtúbulos o en ausencia de calcio (Samson, 1978, Ochs y cols, 1977).

El sistema de transporte anterógrado lento (TAL) mueve los microtúbulos, los neurofilamentos, los microfilamentos, proteínas solubles y algunas mitocondrias. El subcomponente SCA del TAL se mueve entre 0.2-2 mm/día, transportando principalmente tubulina y las tres proteínas de los neurofilamentos (Lasek y Hoffman, 1976). El subcomponente SCB del TAL se mueve a velocidades 3-4 veces mayores, transportando diferentes proteínas de composición no conocida, excepto actina (Black y Lasek, 1980).

Las velocidades de TAL varían claramente con los diferentes tipos de nervios, y en un determinado tipo con la edad y la longitud axonal. No es claro si la velocidad está influenciada por la temperatura, la actividad eléctrica o el metabolismo del soma, y aunque parece ser que puede

temporalmente continuar en axones separados del soma, el TAL cesa si se bloquea la síntesis proteica pericarial (Grafstein, 1980).

El sistema de transporte retrógrado (TR) mueve en dirección al soma neuronal materiales previamente transportados en sentido anterógrado, y moléculas captadas en el espacio extracelular por los terminales axonales. Su velocidad es considerada un 30-50 por 100 inferior a la del TAR, y el sistema es sensible a las sustancias químicas o alteraciones físicas que afectan al TAR. TR lento ha sido recientemente demostrado para una proteína de bajo peso molecular (Fink y Gainer, 1980).

Organelas visualizadas microscópicamente tienen movimientos saltatorios bidireccionales, con velocidades similares a las del TAR y TR. La mayoría de ellas son transportadas hacia el soma y parecen ser estructuras prelisosomales y cuerpos multivesiculares (Grafstein, 1977).

Los mecanismos de TAR y TAL no están claramente comprendidos. Una hipótesis propone un sistema de engranaje en el que las organelas transportadas serían propulsadas por la interacción con los microtúbulos y otros constituyentes longitudinales del axón (Ochs, 1972). Otra hipótesis atribuye el movimiento de las organelas transportadas a microcorrientes intraaxonales (Gross, 1975), y una tercera teoría propone el retículo endoplásmico liso presente a lo largo de todo el axón como estructura soportiva responsable del TAR y TR (Droz, 1975).

Agentes que desestructuran los microtúbulos bloquean el TAR, por lo que el papel de estos en el sistema parece ser importante; sin embargo no se conoce si constituyen la maquinaria primaria del movimiento o si solamente forman al armazón longitudinal requerido para el movimiento. El papel del calcio es también poco claro, pero parece ser que puede determinar la afinidad entre el sistema de transporte y el material transportado, y el proceso de carga de materiales en el inicio del sistema de TAR (Ochs, 1981).

El mecanismo del TAL es aún más oscuro. Una primera hipótesis propuso movimientos semiperistálticos de la columna axónica (Weiss, 1969). Recientemente se ha propuesto que la columna axónica es propulsada por su interacción con filamentos actínicos anclados en el axolema (Hoffman y Lasek, 1975). Otros han sugerido que el TAL es solamente un subproducto del TAR, esto es, el producto de movimientos rápidos intermitentes o bidireccionales (Ochs, 1975, Lubinska, 1964).

El transporte axoplásmico juega un papel muy importante en la duración de la vida media de componentes estructurales de la fibra nerviosa. El TAR por ejemplo provee constituyentes al retículo endoplásmico liso, membrana plasmática, vesículas de transmisión sináptica y gránulos neurosecretados. El TR mueve vesículas destinadas a fundirse con lisosomas en el soma neuronal, lo que implica en el reprocesamiento de materiales de la membrana celular. Los elementos estructurales centrales del axón (micro-

túbulos, neurofilamentos y microfilamentos) son transportados por el TAL, y las mitocondrias son movidas intermitentemente en ambas direcciones a diferentes velocidades promedio (Grafstein y Forman, 1981).

El sistema de TR es responsable del transporte al cuerpo celular de material captado por endocitosis en los terminales nerviosos. Alguna de las sustancias captadas y transportadas de esta forma, como el factor de crecimiento del nervio, tienen importantes implicaciones fisiológicas en las funciones de la neurona. Algunos agentes neuropatogénicos como la tetanotoxina y ciertos virus pueden tener acceso al SNC por medio de esta ruta. Un transporte posterior de la toxina tetánica desde el soma a los terminales presinápticos, su liberación y posterior captación por la neurona postsináptica ha sido demostrado (Dumas y cols., 1979).

El transporte axoplásico es fundamental durante la regeneración de la fibra nerviosa y el desarrollo ontogénico. Diferentes cambios en las cantidades y velocidades de material transportado han sido observadas durante regeneración nerviosa (Forman y Berenberg, 1978) reflejando cambios en la síntesis celular, sin embargo, su significado funcional en la mayor parte de los casos no es entendido. La correspondencia entre la velocidad del TAL y la velocidad de regeneración nerviosa sugiere un papel importante de este sistema en el proceso de elongación de la fibra, mientras que el TAR suministraría los materiales para la reconstrucción axonal y el TR pudiera servir de sistema de intercomunicación con el soma celular durante la regeneración (Grafstein y MacQuarrie, 1978).

La velocidad del TAR aumenta hasta 2-3 veces durante el curso de la maduración, mientras que el TAL es 2-3 más rápido en animales inmaduros que en los adultos (Specht, 1977).

El transporte axoplásico juega también un papel importante en las funciones tróficas celulares, y la interrupción del mismo por medios farmacológicos o físicos es inmediatamente seguido de cambios en el tronco axónico, los terminales sinápticos y la célula postsináptica. El tiempo de aparición de cada cambio está posiblemente relacionado con la deplección de posibles factores tróficos suministrados normalmente por el TAR. Factores liberados en las sinapsis terminales y captados por las células postsinápticas, algunos ya demostrados, como aminoácidos o nucleósidos, pueden ser la base de acciones tróficas interneuronales (Lubinska, 1975).

Una variedad de condiciones patológicas han sido relacionadas con posibles alteraciones en los diferentes sistemas de transporte. Las neuropatías periféricas, en especial las tóxicas y las hereditarias, están suscitando numerosas investigaciones en los últimos años en sus posibles relaciones con anomalías de los sistemas de transporte. Sin embargo, los estudios sobre la acción de los neurotóxicos en los mecanismos de transporte han producido resultados extremadamente variados, y en ocasiones contradictorios. Algu-

nas de estas variaciones pueden ser atribuidas a las diferentes técnicas de estudio utilizadas, a la diferencia en la severidad de las lesiones producidas por el tóxico o a diferencias entre las regiones del nervio donde se ha estudiado su transporte. Parece bastante posible que diferentes neurotóxicos afecten al transporte en diferentes maneras; así la acrilamida y los hexocarbonos han sido relacionados con alteraciones del TAR (Spencer y Schaumburg, 1976), el β . β' -iminodipropionitrilo con anomalías en los sistemas de TAL (Griffin y cols, 1978), y el piridinetione de zinc con alteraciones en el proceso de giro del material transportado en los terminales sinápticos cuando inicia el TR (Sahenk y Mendell, 1980).

Diferentes anomalías en las velocidades de transporte o en la cantidad de material transportado han sido descritos en estudios *in vitro* de nervios de pacientes con diabetes mellitus, uremia o Dejerine-Sottas (Brimijoin y Dyck, 1979), en la distrofia muscular murina (McLane y McClure, 1977), deficiencia de vitamina E (Samson, 1978), tratamientos con monoaminas o inhibidores de la monoaminoxidasa (Guy y cols, 1978), en la degeneración motoneuronal del Wobbler Mouse (Bradley y Jaros, 1973) e hipertensión intraocular (Minckler y cols, 1977), y su posibilidad es considerada en el papiledema (Tso y Hayreh, 1977). Sin embargo, la relación causa-efecto entre la anomalía en el transporte axoplásmico y la degeneración o distrofia de la fibra nerviosa sigue sin haberse demostrado en la mayoría de estas condiciones, y es posible que las alteraciones en los mecanismos de transporte reflejen solamente disfunción de la célula nerviosa secundaria a otras causas, y no que sean ellas las causantes directas de su degeneración.

3. Neurotoxicidad de la acrilamida:

La acrilamida ($\text{CH}_2 = \text{CH. CONH}_2$) se utiliza en su forma polimérica como agente floculante en la separación de sólidos en soluciones acuosas. Sus usos industriales son múltiples: en operaciones de minas, en el procesamiento de desechos industriales, en la purificación de las aguas, en la industria del papel y cartón como sustancia endurecedora, y en la construcción de túneles y minas como sustancia compacta aislante de la humedad.

Inmediatamente después de su introducción en la industria se conocieron sus características neurotóxicas, y desde entonces repetidos casos de intoxicación han sido descritos. La acrilamida es tóxica en su forma monomérica, y deja de serlo cuando se polimeriza. Su efecto es acumulativo en el sistema nervioso, por lo que pequeñas dosis cuando son repetidas llevan a la intoxicación. La causa más frecuente de adquisición de la enfermedad es a través del contacto del tóxico con la piel, ingesta o inhalación (Fullerton, 1970, Kuperman, 1957).

La intoxicación produce somnolencia, falta de concentración, desorien-

tación, confusión, alteraciones de la memoria y ataxia cuando la intoxicación es de forma aguda. En forma crónica, sin embargo, el cuadro predominante es el de una neuropatía sensorial y motora, distal periférica. La neuropatía es preferentemente motora, con debilidad y atrofia muscular de las manos y pies que progresan proximalmente. Los síntomas sensoriales son adormecimiento, pérdida de sensación y reflejos y excesiva sudoración de las partes distales del cuerpo (Spencer y Schaumburg, 1974).

Morfológicamente produce una degeneración distal de los axones de mayor calibre (*dying-back neuropathy*) afectando, en primer lugar, los axones más largos, esto es, las fibras nerviosas que llegan hasta los pequeños músculos de las manos y pies, siendo posteriormente afectados axones de menor calibre y longitud (Spencer y Schaumburg, 1974).

La neuropatía ha sido estudiada en sus aspectos morfológicos ampliamente. El primer cambio observado es la acumulación de neurofilamentos en las zonas terminales del nervio. Posteriormente zonas paranodales de la zona preterminal del axón se ensanchan en su parte proximal, apareciendo afectados varios nodos consecutivos de manera simultánea. La parte paranodal distal distrofia y el axón se estrecha hasta que llega a degenerar, muriendo desde ese nodo distalmente. Si la intoxicación continua, nodos más proximales se verán afectados, y la zona distal a esos nodos degenerará y morirá, y el proceso irá avanzando proximalmente. Las alteraciones morfológicas son observadas en nervios motores principalmente, sin embargo, los nervios sensitivos con terminación en los corpúsculos de Pacini están también estructuralmente afectados (Schaumburg y cols, 1974).

En animales de laboratorio la neuropatía por acrilamida es fácilmente reproducible. Clínicamente produce un cuadro similar al humano, con degeneración distal de los nervios periféricos sensitivos y motores. En forma subaguda aparecen síntomas de intoxicación del sistema nervioso central en forma de ataxia truncal, disminución de la actividad motora general y cierta somnolencia. Morfológicamente es también similar a la intoxicación en el hombre. Su similaridad clínica y patológica con las neuropatías periféricas distales humanas, hacen de la neuropatía experimental por acrilamida un modelo animal muy adecuado para la investigación de las alteraciones bioquímicas en este tipo de neuropatías (Fullerton y Barnes, 1966).

4. Acrilamida y transporte axoplásmico

La causa del fenómeno *dying back* en la neuropatía por acrilamida, lo mismo que en otras neuropatías distales, sigue sin estar aclarada. En el caso de la acrilamida, aunque parece existir una disminución de la síntesis proteica en el soma neuronal, ésta no parece ser la causa directa de la

neuropatía, ya que un análogo de la acrilamida, la metilén-bisacrilamida produce similar déficit en la síntesis de proteínas y, sin embargo, no produce neuropatía (Schotman y cols., 1977, 1978).

La hipótesis de alteraciones en el transporte axoplásmico (Spencer y Schaumburg, 1974) ha sido frecuentemente sugerida. En esta hipótesis se asume que la acrilamida interfiere con el mecanismo de carga de materiales en el inicio del axón, o con el propio transporte a lo largo de la fibra. Si una cantidad normal de material es transportado distalmente a velocidad reducida, se producirá un incremento progresivo en el retraso de la llegada del material, mayor contra más larga sea la distancia al soma neuronal. Alternativamente, si la velocidad de transporte es normal, pero la cantidad de material que se carga en el sistema de transporte es menor de la normal, la cantidad de material disponible por unidad de tiempo en las zonas distales neuronales también disminuirá. Los axones con mayores demandas metabólicas, los más anchos, y mayor longitud serían los primeros afectados, y las zonas de éstos de mayor sobrecarga metabólica, las primeras en exhibir signos de distrofia celular. Ambas posibilidades pudieran incluso estar combinadas.

Los estudios del transporte axoplásmico en la neuropatía por acrilamida han sido escasos, e incluso contradictorios. Pleasure y cols. (1969), examinaron en gatos intoxicados con acrilamida y en animales control, el movimiento de una cresta de radioactividad en el nervio ciático producida por proteínas que habían incorporado ^3H -leucina previamente inyectada en la médula espinal. Los gatos intoxicados por la acrilamida no exhibieron cresta de radioactividad en el transporte lento, y esto fue implicado como causa de la neuropatía.

Posteriormente Bradley y Williams (1973) estudiaron los dos sistemas de transporte anterógrado en gatos intoxicados por acrilamida mediante inyección de aminoácidos precursores en los ganglios dorsales. Contrariamente a los hallazgos de Pleasure y cols., su estudio no encontró diferencias en el transporte anterógrado lento entre los animales intoxicados y los animales control. Encontraron, sin embargo, un decremento en la velocidad de la cresta de radioactividad del transporte rápido que Bradley y Williams no consideraron suficiente como para ser la causa de la neuropatía.

Sumner y cols. (1976), utilizando la misma técnica que Bradley y Williams (1973) encontraron un retraso de un 10 por 100 en la velocidad de la cresta de radioactividad en los animales intoxicados. Rasool y Bradley (1978) utilizando el método de la doble ligadura encontraron un decremento de un 49 por 100 en el TAR y normalidad del transporte retrógrado en ratas intoxicadas por acrilamida.

Sahenk y Mendell (1981) estudiaron el proceso de giro de material marcado en los terminales nerviosos, y su acumulación distal a una ligadura

colocada en el segmento distal del nervio ciático de ratas intoxicadas por acrilamida y 2,5—hexanodiona. En ambas intoxicaciones hubo un retraso en el tiempo de inicio de la acumulación y una disminución en la cantidad de material radioactivo que volvía del segmento distal.

La acción de la acrilamida sobre los sistemas de transporte sigue sin estar aclarada, y en caso de que exista, no se conoce si es de suficiente importancia como para considerarla la causa primaria de la neuropatía, o bien si es sólo una manifestación secundaria a la degeneración de la fibra nerviosa producida por el efecto de la acrilamida sobre otros sistemas del axón, hasta el momento desconocidos.

El presente estudio se ha realizado con objeto de determinar las posibles anomalías en los sistemas de transporte axoplásico rápido y retrógrado, y su relación con la aparición de la degeneración axonal en los diferentes períodos de la intoxicación por acrilamida.

5. Acetil-colín-esterasa y Colín-acetil-transferasa

Acetil-colín-esterasa (AChE, acetilcolina hidrolasa, EC 3.1.1.7) es el enzima que hidroliza la acetilcolina en las sinapsis de las neuronas colinérgicas. La AChE es sintetizada en la zona perinuclear y transportada hasta los terminales nerviosos donde será utilizada (Lubinska, 1964, Ranish y Ochs, 1972).

Histoquímicamente su presencia en los axones ha sido localizada en relación con estructuras vesículo-tubulares, el retículo endoplásmico liso y el axolema (Kasa, 1968, Brimijoin y cols., 1978).

En nervio periférico las células de Schwann carecen de AChE actividad excepto en los últimos estadios de la degeneración walleriana, por lo que la localización preferentemente intraaxonal del enzima lo hacen útil en los estudios de transporte intraneuronal en nervio periférico. Los análisis bioquímicos pueden hacerse a partir de homogeneizados completos del nervio sin intentar la separación celular, extremadamente compleja. Los cambios en la actividad de la AChE en el homogeneizado del nervio reflejan casi exclusivamente cambios en el compartimento axónico (Lubinska y Nimierko, 1971).

Varias formas moleculares de AChE han sido descritas en diferentes nervios de diferentes especies animales. En los mamíferos, las formas de menor peso molecular constituyen la mayor parte de la actividad total de la AChE, son en su mayor parte estacionarias y relacionadas con el axolema (Brimijoin y cols., 1978). Una pequeña parte de la AChE, la de mayor peso molecular, 16S, es móvil y se colecciona con rapidez a ambos lados de una ligadura situada en el nervio (DiGiamberardino y Couraud, 1978).

La AChE es transportada en sentido anterógrado a velocidades similares a las calculadas para las proteínas marcadas transportadas por el sistema de transporte rápido; y en sentido retrógrado a velocidades intermedias (Ranish y Ochs, 1972, Couraud y DiGiambardino, 1980). Anomalías en el transporte de este enzima son indicativas de anomalías en los sistemas de transporte anterógrado rápido y retrógrado, y por esta razón se ha utilizado el análisis de la actividad de la AChE en el presente estudio.

La Colín-acetil-transferasa (ChAT, EC 2.3.1.6) cataliza la formación de acetilcolina a partir de colina y acetil-CoA en los terminales colinérgicos. La ChAT es sintetizada perinuclearmente y transportada a los terminales nerviosos donde ejerce su acción (Fonnum y cols., 1973). El enzima se encuentra en el compartimiento axónico en forma soluble, aunque pequeñas proporciones pueden estar presentes en la membrana, y su transporte axoplásmico es a través del sistema anterógrado lento (Tucek, 1975, Fonnum y cols., 1973). Existe cierta controversia en cuanto a la fracción del enzima que es móvil, y a la existencia o no de transporte retrógrado del mismo (Tucek, 1975, Wooten y Cheng, 1980, Fonnum y cols., 1973). Anomalías en el transporte de ChAT son indicativas de anomalías en el sistema de transporte axoplásmico lento.

MATERIAL Y METODOS

1. Animales y tipo de intoxicación

Veinticinco ratas hembra Sprague-Dawley, con un peso inicial de 150-175 gr. (Charles River Breeding Laboratories, Boston, Massachusetts) fueron intoxicadas, de manera subaguda, con 250 ppm. de acrilamida en el agua de beber, lo que equivale a una dosis de 14-15 mg/kg/día.

Otras 15 ratas, de similares características y peso que las anteriores, fueron utilizadas como controles en los diferentes tiempos del estudio. Un tercer grupo de animales, 16 intoxicados y 16 control, se utilizó en los experimentos previos.

2. Tiempos de estudio de la intoxicación

Los animales, en grupos de 5 intoxicados y 3 control, fueron estudiados en los siguientes tiempos:

- a. 10 días de intoxicación: Ninguno de los animales intoxicados presentaba signos clínicos de la enfermedad.
- b. 18 días de intoxicación: Algunos de los animales intoxicados presentaban ligera debilidad de las patas posteriores y menor ganancia de peso en comparación con los animales controles. Los animales sacrificados en este tiempo no presentaban signos clínicos de la enfermedad.
- c. 25 días de intoxicación: Todos los animales intoxicados presentaban claros signos de neuropatía por acrilamida, con parésis de las extremidades posteriores de tipo preferentemente distal, disminución de la sensibilidad dolorosa en las mismas, gran ataxia truncal, disminución de la actividad

motora general y no ganancia de peso. Una vez sacrificado este grupo de animales, la intoxicación fue cesada en el resto de los animales.

d. 20 días post-cesación de la intoxicación: Los animales presentaban aún signos clínicos de neuropatía distal, aunque su intensidad era media, en comparación con el grupo anterior.

e. 30 días post-cesación de la intoxicación: Clínicamente los signos de neuropatía eran mínimos.

3. Técnica utilizada para el estudio del transporte axoplásmico

La técnica utilizada ha sido la de ligadura, simple y doble, siendo el enzima marcador del transporte axoplásmico ortógrado rápido y del retrógrado la acetil-colinesterasa (acetilcolina-acetil-hidrolasa; EC 3.1.1.7). En otro diferente estudio, en su inicio en la actualidad, se utiliza el enzima colinacetil-transferasa (acetil-CoA: colina 0-acetil-transferasa; EC 2.3.1.6) como marcador de las posibles alteraciones de la acrilamida en el sistema de transporte axoplásmico lento.

En la técnica de la doble ligadura el animal es anestesiado con éter anhidro, y el nervio ciático de una extremidad es expuesto quirúrgicamente y ligado a nivel del nodo ciático con seda 0000. Otra ligadura, es realizada en el nervio cinco milímetros por encima de la división tibio-peroneal, siendo la distancia entre ambas ligaduras variable, entre 18 y 23 mm. La incisión quirúrgica es cerrada por planos y se deja al animal recuperar. Seis horas después los animales eran sacrificados por exsanguinación. El nervio ligado y el nervio ciático contralateral eran removidos, limpiados de tejido graso y conectivo circundante y endurecidos por congelación inmediata en anhidrido carbónico sólido. Segmentos de 3 mm. de longitud fueron cortados inmediatamente por encima y debajo de ambas ligaduras, en el centro del segmento ligado, y otros dos en el nervio contralateral. Estos dos últimos servirían como control de la actividad de la AChE en nervio ciático no ligado.

La técnica de la ligadura única fue utilizada para los estudios previos de acumulación de AChE en las horas siguientes a la ligadura, y obtención de las curvas de acumulación en el sentido próximo-distal y disto-proximal.

El ciático contralateral inmediatamente por encima de la bifurcación tibio-peroneal fue utilizado para los estudios morfológicos simultáneos a los bioquímicos de la intoxicación por acrilamida. El segmento del nervio fue fijado en glutáldehido al 3,6 por 100 durante 2 horas y dejado en buffer fosfato sódico 0.1M, pH 7.4, para posterior estudios por microscopía óptica y electrónica.

Similares ligaduras y técnicas de disección fueron utilizadas en los animales control. La temperatura del nervio se mantuvo entre 33 y 36º C.

4. Preparación de los tejidos y determinación de la actividad de la AChE

Cada segmento de nervio fue homogeneizado en 1 ml de buffer fosfato sódico 0.1M, pH 7.4 (0.1M fosfato monosódico, 0.1M fosfato disódico, 0.5% Triton X-100, 50 mg% albúmina sérica bovina), manteniendo la temperatura exterior a 4ºC. 50 μ l del homogenado resultante fueron empleados, por duplicado, en cada ensayo.

La determinación de la actividad de la AChE fue realizada por el método radiométrico de Potter modificado (Potter, 1967), utilizando como sustrato 0.28 mM ^{14}C -acetilcolina ioduro y 4 mM acetilcolina cloruro en solución 10 mM fosfato sódico, 19 mM cloruro magnésico, pH 7.4. La molaridad final de la mezcla de incubación era de 2.14 mM, óptima para la reacción enzimática.

La mezcla fue incubada a 37ºC durante 20 minutos, siendo terminada la reacción mediante la adición de 100 μ l de CIH 0.2N a 4ºC. El ácido acético resultante de la reacción fue separado de la mezcla mediante la adición de 2 ml de tolueno-isoamylalcohol 5:1 y posterior agitación durante 30 segundos. Una vez la solución era homogénea se centrifugaba a 2000 rpm durante 7 minutos. La capa orgánica superior fue separada, colocada en un vial de escintilación al que se le añadió 10 ml de tolueno fosfato como licuesciente. La beta-emisión de la muestra fue contada durante períodos de 10 minutos en un Packard 2650 espectrómetro de escintilación líquida. La actividad enzimática fue expresada en nanomoles de sustrato hidrolizado por hora por 3 mm de nervio.

5. Determinación de la cantidad de enzima transportado, de la fracción móvil y de la velocidad del transporte en el sentido ortógrado y retrógrado

La actividad del enzima transportado viene dada por la diferencia entre la actividad enzimática en el segmento proximal a la ligadura proximal y la actividad enzimática en el segmento control del nervio contralateral. Expresada en nanomoles de actividad por 24 horas, la fórmula es:

$$E_t = (E_1 - E_c) \times 24 / t, \text{ en la que}$$

E_1 : Actividad enzimática en el segmento proximal a la ligadura proximal.
 E_c : Actividad enzimática en el segmento (3 mm) del nervio contralateral.
 t : Tiempo de mantenimiento de la ligadura.

El porcentaje de enzima móvil en el nervio viene dado por la diferencia entre la actividad del segmento del nervio contralateral y el segmento central del segmento ligado, siempre que la velocidad de transporte sea suficientemente rápida para permitir la total evacuación del segmento central durante las horas de ligadura. Valores más exactos, e independientes de esa suposición vienen dados por la fórmula:

$$E_m = (E_4 - E_3) \times 100 / E_t, \text{ en la que}$$

E_4 : Actividad enzimática en el segmento proximal a la ligadura distal.

E_3 : Actividad enzimática en el segmento central entre ambas ligaduras.

E_t : Actividad de todo el segmento ligado.

La actividad enzimática en los 3 mm centrales del segmento ligado es una medida de la actividad de la fracción estacionaria del enzima.

La velocidad aparente de transporte, esto es, presuponiendo que todo el enzima es móvil y la acumulación del mismo es lineal durante el tiempo en que el nervio ha sido ligado, viene dada por la fórmula siguiente, expresada en mm/24 horas:

$$V_a = [(E_1 - E_c) / E_c] \times (L / t) \times 24, \text{ en la que}$$

E_1 : Actividad enzimática en el segmento proximal a la ligadura proximal.

E_c : Actividad enzimática en el segmento (3 mm) del nervio contralateral.

L : Longitud del segmento (3 mm).

t : Tiempo de acumulación del enzima (6 horas).

La velocidad real o absoluta viene determinada por la relación entre la velocidad aparente y la fracción móvil del enzima, expresada en mm/24 horas en la siguiente fórmula:

$$V = (V_a / E_m) \times 100 = V_a \times (100 / E_m), \text{ en la que}$$

V_a : Velocidad aparente del enzima.

E_m : Fracción móvil del enzima.

Los cálculos correspondientes al transporte axoplásmico retrógrado se obtienen con similares fórmulas, sustituyendo las actividades enzimáticas proximales por las distales de la correspondiente ligadura. Esto es:

$$E_t = (E_5 - E_c) \times 24 / t, \text{ en la que}$$

E_t : Actividad enzimática transportada retrógradamente, en nmol/24 horas.

E_5 : Actividad enzimática en el segmento distal a la ligadura distal.

E_c : Actividad enzimática en el segmento (3 mm) del nervio contralateral.

t : Tiempo de mantenimiento de la ligadura.

$$E_m = (E_2 - E_3) \times 100 / E_t, \text{ en la que}$$

E_m : Porcentaje de enzima móvil transportado de manera retrógrada.

E_2 : Actividad enzimática en el segmento distal a la ligadura proximal.

E_3 : Actividad enzimática en el segmento central entre ambas ligaduras.
 E_t : Actividad enzimática de todo el segmento ligado.

$$V_a = [(E_3 - E_c) / E_c] \times (L / t) \times 24, \text{ en la que}$$

V_a : Velocidad aparente en sentido distoproximal, en mm/24 horas.

E_3 : Actividad enzimática del segmento distal a la ligadura distal.

E_c : Actividad enzimática en el segmento (3 mm) del nervio contralateral.

L : Longitud del segmento utilizado (3 mm).

t : Tiempo de acumulación del enzima (6 horas).

6. Preparación de los tejidos para su estudio morfológico

Inmediatamente después de sacrificado el animal, 15 mm del nervio ciático contralateral al ligado eran seccionados por encima de la bifurcación tibio-peroneal y procesados para estudios morfológicos en los mismos períodos de intoxicación que los estudios bioquímicos.

Una vez limpiado de tejido conectivo y graso circundante, el segmento del nervio en cada animal fue estirado y fijado en glutáaldehido en solución 0.1 M de fosfato sódico (pH 7.4) al 3.6% durante 2 horas, y postfijado en solución ósmica de cromo al 2%. Posteriormente fue deshidratado en concentraciones graduadas de alcohol y embebido en epoxy resina. Secciones de 0.5 μm fueron teñidas con azul de toluidina para microscopía óptica, y secciones de 0.1 μm se tiñeron con uranil acetato y citrato plumbico para su estudio por microscopía electrónica.

7. Material y reactivos

La ^{14}C -ACh ioduro fue obtenida de New England Nuclear, Boston, Massachusetts; el tolueno e isoamyl-alcohol de Fisher Scientific Co., Fair Lawn, New Jersey; el liquencint de National Diagnostics, Somerville, New Jersey; la ACh cloruro, el fosfato monosódico y disódico de Calciochem-Behring Co., la Jolla, California; y el resto de los reactivos químicos de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri.

Fueron utilizados un homogeneizador Wheaton, una incubadora Dubnoff, un mezclador Vortex, una centrifugadora Damon/IEC y un contador de escintilación líquida Packard, modelo Tri-Carb 2660. La acrilamida monómero fue obtenida de Eastman Kodak Company, Rochester, New York.

RESULTADOS

1. Acumulación en segmentos proximales y distales a la ligadura única en los experimentos previos

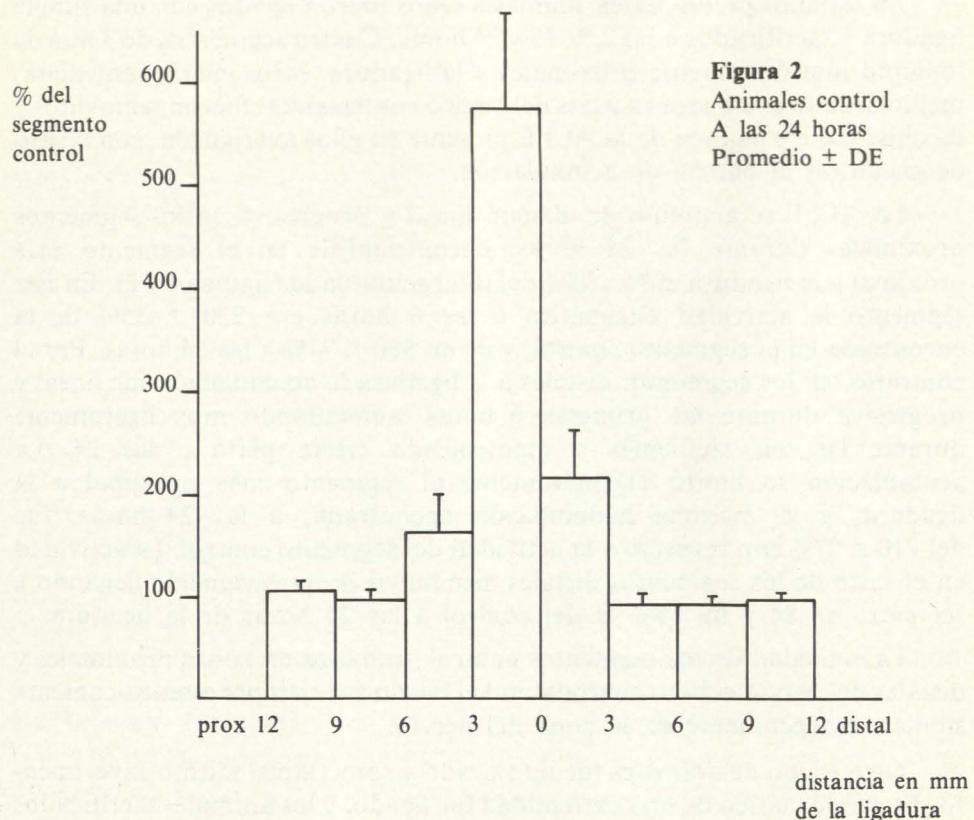
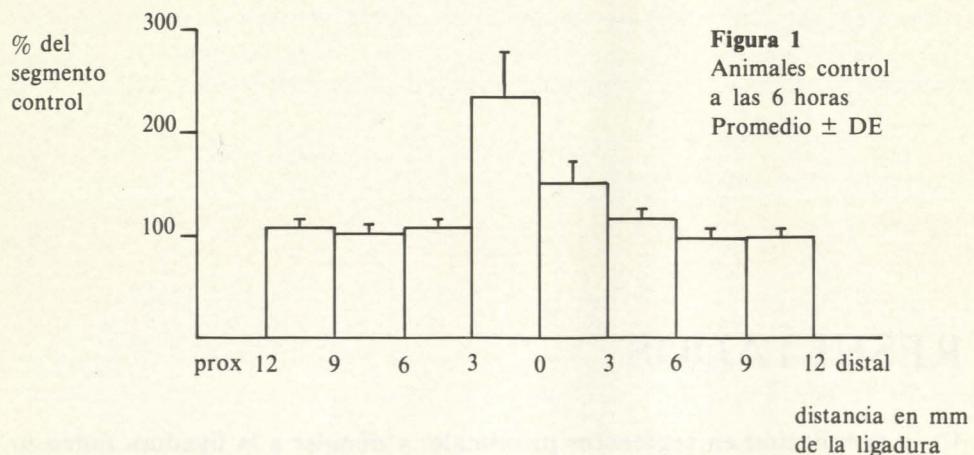
En estudios preliminares, animales sanos fueron ligados con una simple ligadura y sacrificados a las 2, 6, 12 y 24 horas. Cuatro segmentos de 3 mm de longitud inmediatamente proximales a la ligadura, otros cuatro inmediatamente distales a la ligadura y tres del ciático contralateral fueron removidos y la actividad enzimática de la AChE presente en ellos averiguada, con objeto de encontrar el patrón de acumulación.

La AChE se acumuló de manera lineal y progresiva en los segmentos proximales durante las 24 horas, encontrándose en el segmento más proximal a la ligadura el 95 a 98% del total acumulado (figuras 1 y 2). En este segmento la actividad enzimática a las 6 horas era $230 \pm 35\%$ de la encontrada en el segmento control, y de un $580 \pm 71\%$ a las 24 horas. Por el contrario, en los segmentos distales a la ligadura la acumulación fue lineal y progresiva durante las primeras 6 horas, aumentando muy ligeramente durante las seis siguientes y manteniendo cierto plató a las 24. La acumulación se limitó exclusivamente al segmento más proximal a la ligadura, y la máxima acumulación encontrada, a las 24 horas, fue del $210 \pm 57\%$ con respecto a la actividad del segmento control. La actividad en el resto de los segmentos distales disminuyó progresivamente llegando a ser entre un 84 y un 88% la del control a las 24 horas de la ligadura.

La actividad de los segmentos control, tomados en zonas proximales y distales del nervio ciático contralateral al ligado fue siempre estadísticamente similar, independiente de la zona del nervio.

Otro grupo de animales fue intoxicado y sometido al mismo experimento. El nervio ciático de una extremidad fue ligado, y los animales sacrificados

ACTIVIDAD ENZIMATICA ACUMULADA EN AMBOS LADOS DE LA LIGADURA



a las 2, 6, 12 y 24 horas, con objeto de estudiar el patrón de acumulación en los segmentos proximales y distales a la ligadura. En sentido ortógrado la AChE se acumuló progresiva y linealmente durante las primeras 6 horas. El ritmo de acumulación disminuyó ligeramente a las 12 horas, y más claramente a las 24 (fig. 3 y 4). La acumulación, de igual manera que en los animales sanos, estuvo prácticamente limitada al segmento más proximal a la ligadura. La actividad del total enzimático acumulado en 24 horas fue un $24 \pm 13\%$ inferior a la actividad enzimática total en los animales sanos.

En sentido distoproximal, la AChE se acumuló de manera lineal durante las primeras 6 horas, siendo de mucha menor intensidad la acumulación en las 6 siguientes horas, y mínima en las últimas 12 horas del estudio. La actividad enzimática total transportada a las 6 horas fue un $26 \pm 15\%$ inferior a la transportada en los animales sanos, mientras a las 24 horas, el total de enzima transportado hasta la ligadura en sentido distoproximal era un $29 \pm 12\%$ inferior a la transportada en la misma dirección en los animales sanos.

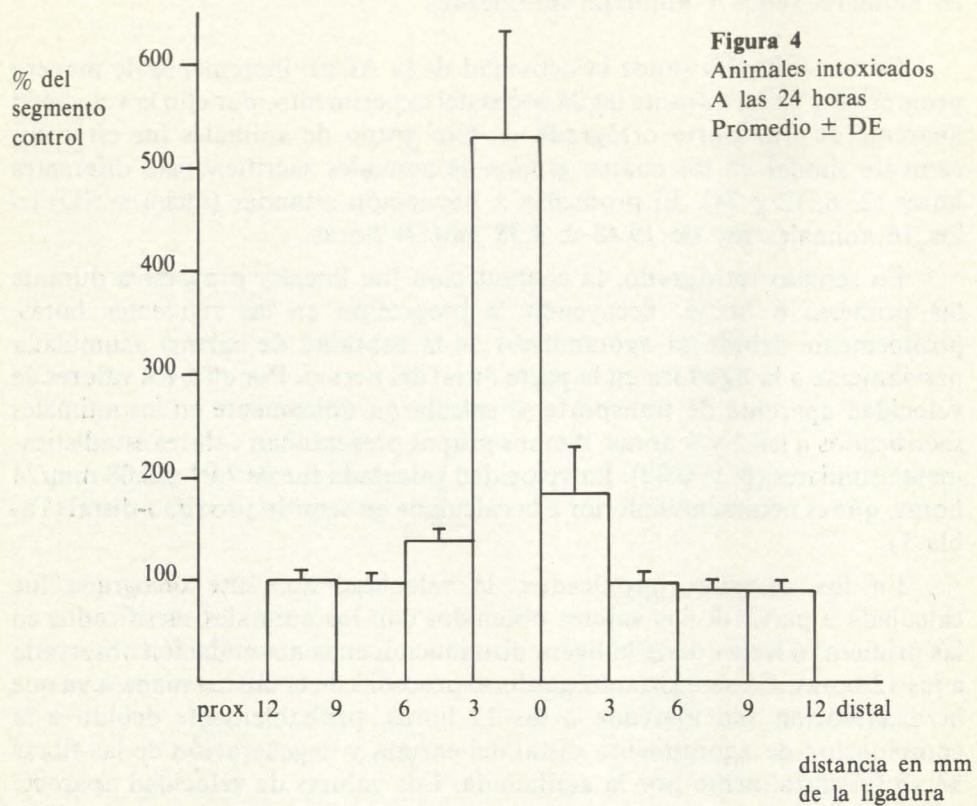
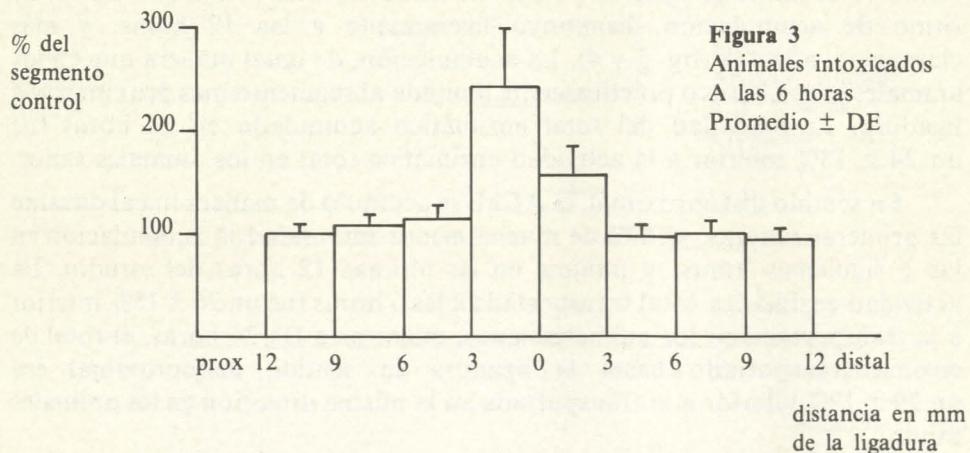
a. Velocidad aparente de transporte en sentido ortógrado y retrógrado en animales sanos y animales intoxicados

En los animales sanos la actividad de la AChE incrementó de manera progresiva y lineal durante las 24 horas del experimento, por ello la velocidad aparente de transporte ortógrado en este grupo de animales fue estadísticamente similar en los cuatro grupos de animales sacrificados a diferentes horas (2, 6, 12 y 24). El promedio \pm desviación estandar (mean \pm SD) en los 16 animales fue de 19.48 ± 3.38 mm/24 horas.

En sentido retrógrado, la acumulación fue lineal y progresiva durante las primeras 6 horas, decayendo la progresión en las siguientes horas, posiblemente debido al agotamiento de la cantidad de enzima acumulada previamente a la ligadura en la parte distal del nervio. Por ello, los valores de velocidad aparente de transporte se calcularon únicamente en los animales sacrificados a las 2 y 6 horas. Ambos grupos presentaban valores estadísticamente similares ($p > 0.02$). La velocidad calculada fue de 7.01 ± 2.08 mm/24 horas, que es netamente inferior a la calculada en sentido próximo-distal (Tabla 1).

En los animales intoxicados, la velocidad aparente ortógrada fue calculada a partir de los valores obtenidos con los animales sacrificados en las primeras 6 horas dada la ligera disminución en la acumulación observada a las 12 horas. En sentido retrógrado se procedió de la misma manera ya que la disminución fue marcada a las 12 horas, probablemente debido a la combinación de agotamiento distal del enzima y degeneración de las fibras nerviosas distalmente por la acrilamida. Los valores de velocidad aparente

ACTIVIDAD ENZIMATICA ACUMULADA EN AMBOS LADOS DE LA LIGADURA



ortógrada y retrógrada fueron 17.16 ± 2.23 mm/24 horas y 6.32 ± 1.81 mm/24 horas respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1

VELOCIDAD APARENTE DE TRANSPORTE Y ACTIVIDAD ENZIMATICA TOTAL TRANSPORTADA[#]

Tipo de transporte	Velocidad aparente en mm/24 horas	Actividad enzimática en unidades/24 horas
Animales control		
Ortógrado	19.48 ± 3.38 (8)	1820 ± 205 (4)
Retrógrado	7.01 ± 2.08 (8)	860 ± 110 (4)
Animales intoxicados		
Ortógrado	17.16 ± 2.23 (8)	1364 ± 313 (4)
Retrógrado	6.32 ± 1.81 (8)	525 ± 101 (4)

[#] Método de ligadura única. Número de animales en paréntesis.
Resultados son el promedio \pm desviación estándar.

b. Actividad de la cantidad total de enzima transportado en 24 horas

La actividad enzimática acumulada en los 3 mm. proximales a la ligadura en los animales sanos sacrificados a las 24 horas de la interrupción del flujo axoplásmico fue de 1812 ± 205 unidades, siendo una unidad el número de nanomoles de acetilcolina hidrolizados en una hora en 3 mm de nervio ciático.

La actividad enzimática acumulada en el segmento inmediatamente distal a la ligadura, al cabo de 24 horas fue de 860 ± 110 unidades/24 horas (Tabla 1).

En los animales tratados con acrilamida la cantidad de acetil-colín-esterasa acumulada en el segmento proximal a la ligadura durante 24 horas fue de 1364 ± 313 unidades/24 horas, esto es, un 20 % menos que en los animales control. Esta disminución de la actividad total es estadísticamente significativa ($p < 0.001$, Student's t-test). En sentido distoproximal la cantidad de AChE acumulada durante 24 horas fue de 525 ± 101 U/24 horas, esto es un 29% menos que en los animales control. Esta disminución es también estadísticamente significativa ($p < 0.01$, Student's t-test) (Tabla 1).

En los animales sanos la proporción de la actividad enzimática en el segmento distal con respecto a la encontrada en el proximal, a las 24 horas

fue de un 48%. En los animales tratados con la acrilamida esta proporción disminuyó a un 39%.

La actividad enzimática en los segmentos control de los animales no tratados con el tóxico fue de 381 ± 51 nanomoles/hora. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes segmentos control obtenidos en zonas proximales (nodo ciático) o zonas más distales del nervio (inmediatamente por encima de la bifurcación tibio-peroneal).

En los animales intoxicados la actividad enzimática en los segmentos control fue de 336 ± 74 nanomoles/hora. La diferencia con la actividad en los segmentos control de los animales no tratados no es estadísticamente significativa ($p > 0.02$, Student's t-test).

2. Transporte ortógrado de AChE durante los diferentes estadios de la intoxicación por acrilamida y comparación con los controles

Veinticinco animales intoxicados fueron sacrificados, en grupos de cinco, a los 10, 18 y 25 días de iniciada la intoxicación, y a los 20 y 30 días después de cesar ésta. Junto a cada grupo fue sacrificado otro grupo de animales sanos de las mismas características que los intoxicados. Seis horas previas al sacrificio, los animales fueron ligados con dos ligaduras en su nervio ciático izquierdo, separadas entre sí entre 18 y 23 mm

Se eligió como tiempo de mantenimiento de la ligadura las 6 horas, porque en los experimentos previos se había demostrado que éste era el tiempo máximo en que la acumulación de la actividad enzimática era progresiva y lineal en los animales intoxicados, tanto en sentido ortógrado como en el retrógrado. Tiempos mayores de 6 horas hubieran permitido mayor acumulación del enzima, pero los cálculos de velocidad aparente, velocidad absoluta y actividad del enzima en 24 horas, hubieran sido erróneos ya que las acumulaciones no se producen de manera lineal a partir de las 6 horas, principalmente en el sentido retrógrado, posiblemente debido al agotamiento del enzima distal a la ligadura distal.

Durante las 6 horas, el enzima situado en el segmento ligado se distribuye, yendo a la parte distal y proximal del mismo, y vaciándose relativamente de él la parte central del segmento ligado. Sin embargo, la AChE, como la mayor parte de los enzimas transportados por medio de los mecanismos de transporte rápido, cambia de dirección al llegar al obstáculo, por lo que es de suponer hay siempre cierta cantidad del enzima que está siendo transportada en un sentido o en otro. Los cálculos estadísticos sobre la fracción móvil del enzima no son afectados por este hecho de manera estadísticamente significativa.

a. Actividad enzimática transportada en 24 horas:

En los animales control la cantidad transportada fue estadísticamente similar, independiente del grupo al que perteneciera el animal. El promedio \pm DE de todos los controles fue de 1732 ± 183 U/24 horas (Tabla 2).

A los 18 días de intoxicación, cuando los animales aún no presentaban signos de la enfermedad, la cantidad total transportada disminuyó, de manera significativa un 16%, y volvió a disminuir a los 25 días de intoxicación, en el periodo clínico de la enfermedad, a un 81.8% del transportado en los animales sanos. A los 20 días de cesar la intoxicación, la cantidad transportada aumentó un 15% sobre los controles. A los 30 días de cesada la intoxicación, la cifra, aunque ligeramente por encima del control, era estadísticamente similar (1843 ± 268 U/24 horas).

Tabla 2

VELOCIDAD APARENTE DE TRANSPORTE ORTOGRADO Y ACTIVIDAD ENZIMATICA TOTAL TRANSPORTADA EN 24 HORAS ORTOGRADAMENTE[#]

Tiempo de intoxicación	Velocidad aparente en mm/24 horas	Actividad enzimática en unidades/24 horas
Animales control	19.13 ± 2.02 (15)	1732 ± 183 (15)
10 días intoxicación	21.52 ± 4.26 (5)*	1875 ± 263 (5)
18 días intoxicación	18.01 ± 3.33 (5)	1459 ± 251 (5)*
25 días intoxicación	21.20 ± 3.26 (5)	1416 ± 242 (5)*
20 días post-intoxic	21.69 ± 3.56 (5)	1987 ± 249 (5)**
30 días post-intoxic	20.90 ± 3.49 (5)	1843 ± 268 (5)

Método de la doble ligadura. Número de animales en paréntesis.

Resultados son el promedio \pm una desviación estándar.

* $p < 0.01$, Student's t-test.

** $p < 0.02$, Student's t-test.

b. Velocidad aparente y fracción móvil del enzima:

La velocidad aparente, esto es, el cálculo obtenido a partir de la base de que todo el enzima es transportado a lo largo del axón, fue de 19.13 ± 2.02 mm/24 horas en los animales control. Aumentó un 10% a los 10 días de intoxicación, disminuyó progresivamente hasta ser de un 94% del control durante el periodo 18 días de la enfermedad, y se normalizó una vez cesada la

intoxicación. La diferencia estadística entre los valores del día 10, del día 18 y los controles no es significativa.

La fracción móvil del enzima en los animales control fue de $4.26 \pm 1.02\%$ del total enzimático. Esta cantidad no varió significativamente hasta el día 25 de la intoxicación en la que aumentó un 34% su valor, y aumentó un 1% más a los 20 días de cesada la intoxicación. Al mes de cesada seguía siendo un 18% mayor que los controles. Sin embargo, estas variaciones no son estadísticamente significativas (Tabla 3).

Tabla 3

FRACCION DE ENZIMA MOVIL Y VELOCIDAD ABSOLUTA EN SENTIDO ORTOGRADO[#]

Tiempo de intoxicación	Enzima móvil en %	Velocidad absoluta en mm/24 horas
Animales control	4.26 ± 1.02 (15)	453 ± 51 (15)
10 días intoxicación	4.56 ± 2.29 (5)	503 ± 85 (5)
18 días intoxicación	4.54 ± 2.28 (5)	393 ± 68 (5)
25 días intoxicación	5.72 ± 2.23 (5)	373 ± 93 (5)
20 días post-intoxic	5.75 ± 2.39 (5)	388 ± 97 (5)
30 días post-intoxic	5.05 ± 2.31 (5)	410 ± 89 (5)

[#] Método de la ligadura doble. Número de animales en paréntesis.

Resultados son el promedio \pm una desviación estándar.

* $p < 0.02$, Student's t-test.

c. Actividad enzimática basal en el nervio

La actividad de la AChE en los segmentos control fue de 386 ± 28 nanomoles/hora. Esta actividad no varió estadísticamente durante el periodo de intoxicación o postintoxicación.

d. Velocidad absoluta de transporte ortógrafo

La velocidad real de transporte en los animales control fue de 453 ± 51 mm/24 horas. Permaneció sin variaciones en los animales intoxicados a los 10 días, pero disminuyó un 13% durante el periodo preclínico de la intoxicación, y un 18% durante el periodo clínico. La velocidad de transporte se mantuvo en similares niveles a los 20 días de haber cesado la

intoxicación, recuperándose hasta valores estadísticamente normales a los 30 días (Tabla 3).

3. Transporte retrógrado de AChE durante los diferentes estadíos de la intoxicación por acrilamida y comparación con los controles

a. Actividad de la cantidad total de enzima transportada en 24 horas

La cantidad de enzima transportada en los animales control fue estadísticamente similar en todos los grupos. El promedio \pm DE de todos los controles fue de 885 ± 93 U/24 horas (Tabla 4), esto es un 49% de la transportada en sentido anterógrado (Tabla 2).

La actividad total transportada disminuyó un 23% durante el periodo preclínico, y un 24% durante la fase clínica de la neuropatía. Se recuperó parcialmente a los 20 días de cesar la intoxicación llegando a ser un 85% de los niveles control, y manteniéndose en esas cifras a los 30 días post-intoxicación.

La cantidad recuperada en el segmento distal, a los 10 días de intoxicación fue un 51% de la obtenida en sentido ortógrado. A los 18 días fue de un 47%, y se mantuvo a esos niveles durante el periodo clínico. Sin embargo, a los 20 días de cesar la intoxicación, sólo un 38% era la cantidad total de enzima transportada en sentido centrípeto. Esta cantidad aumentó a un 42% a los 30 días (Tablas 2 y 4).

Tabla 4

VELOCIDAD APARENTE DE TRANSPORTE RETROGRADO Y ACTIVIDAD ENZIMATICA TOTAL TRANSPORTADA EN 24 HORAS RETROGRADAMENTE[#]

Tiempo de intoxicación	Velocidad aparente en mm/24 horas	Actividad enzimática en unidades/24 horas
Animales control	6.81 ± 0.97 (15)	885 ± 93 (15)
10 días intoxicación	6.32 ± 1.73 (5)	863 ± 195 (5)
18 días intoxicación	5.93 ± 1.87 (5)	$683 \pm 187^*$ (5)
25 días intoxicación	6.32 ± 1.98 (5)	$678 \pm 198^*$ (5)
20 días post-intoxic	6.20 ± 2.02 (5)	$753 \pm 175^{**}$ (5)
30 días post-intoxic	7.78 ± 1.91 (5)	766 ± 173 (5)

[#] Método de la ligadura doble. Número de animales en paréntesis.

Resultados son el promedio \pm una desviación estándar.

* $p < 0.001$, Student's t-test.

** $p < 0.02$, Student's t-test.

b. Velocidad aparente retrógrada y fracción móvil del enzima

La velocidad aparente en sentido distoproximal en los animales control fue de 6.81 ± 0.97 mm/24 horas. Disminuyó un 13% durante el periodo preclínico, recuperándose hasta un 91% del control a los 20 días post-intoxicación, y siendo un 14% mayor a los 30 días de cesar la enfermedad (7.78 ± 1.91 mm/24 horas) (Tabla 4). La diferencia entre los valores del grupo control y los obtenidos a los 18, 25 y postintoxicación no son estadísticamente significativos.

La fracción móvil del enzima transportada retrógradamente fue del $3.79 \pm 1.02\%$ del total. Esta cantidad no varió de manera significativa hasta el periodo clínico de la neuropatía, en que aumentó un 22%, manteniéndose en esos niveles a los 20 días de cesar la intoxicación, y aumentando a un 24% a los 30 días ($4.71 \pm 1.78\%$) (Tabla 5).

Tabla 5

FRACCION DE ENZIMA MOVIL Y VELOCIDAD ABSOLUTA EN SENTIDO RETROGRADO[#]

Tiempo de intoxicación	Enzima móvil en %	Velocidad absoluta en mm/24 horas
Animales control	3.79 ± 1.02 (15)	181 ± 34 (15)
10 días intoxicación	3.61 ± 1.85 (5)	180 ± 61 (5)
18 días intoxicación	3.99 ± 1.76 (5)	$150 \pm 49^*(5)$
25 días intoxicación	4.63 ± 1.89 (5)	$136 \pm 46^*(5)$
20 días post-intoxic	4.60 ± 1.65 (5)	$134 \pm 63^*(5)$
30 días post-intoxic	4.71 ± 1.78 (5)	166 ± 64 (5)

[#] Método de la doble ligadura. Número de animales en paréntesis.

Resultados son el promedio = una desviación estándar.

* $p < 0.02$, Student's t-test.

c. Velocidad absoluta de transporte retrógrado

La velocidad real de transporte en los animales control, obtenida mediante la velocidad aparente y la fracción móvil del enzima fue de 181 ± 34 mm/24 horas. Permaneció sin variar a los 10 días de intoxicación, disminuyendo un 17% a los 18 días. Durante el periodo clínico

de la enfermedad, la velocidad absoluta fue de 136 ± 46 mm/24 horas, esto es un 25% inferior a los controles. Permaneció en los mismos niveles a los 20 días de cesar la intoxicación, pero se recuperó a niveles normales a los 30 días (Tabla 5).

La velocidad absoluta de transporte retrógrado en los animales control es aproximadamente un 40% de la velocidad absoluta en sentido ortógrafo. Durante el periodo de intoxicación, y posterior, esta proporción entre la velocidad anterógrada y retrógrada fue de un 35%. Treinta días después de cesar la intoxicación, la proporción volvió a ser de un 40% (Tablas 3 y 5).

4. Alteraciones morfológicas del nervio ciático durante los diferentes estadios de la intoxicación

La parte del nervio ciático seleccionada fue la situada inmediatamente por encima de la bifurcación tibio-peroneal. Segmentos inmediatamente por encima del utilizado para los estudios morfológicos fueron los que se utilizaron para control de la actividad básica de AChE en el nervio. El segmento de nervio utilizado para los estudios morfológicos corresponde pues, aproximadamente, con la zona donde se estudiaba el transporte axoplásico en el nervio opuesto ligado.

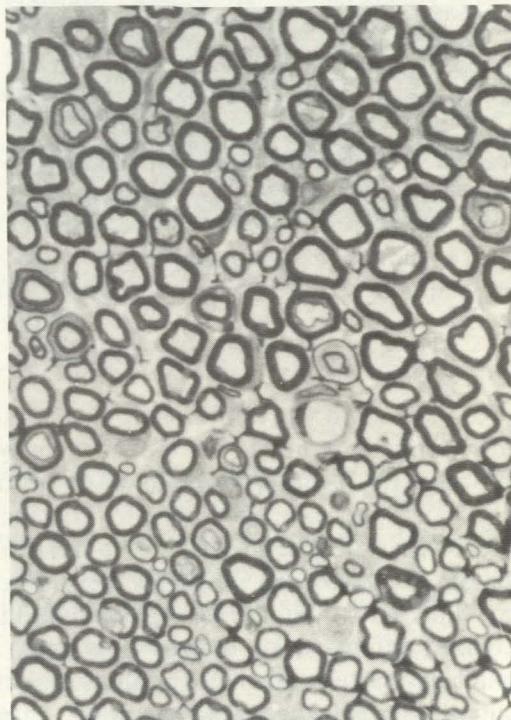


Fig. 5. Ciático de rata control $\times 800$.

a. A los 10 días de intoxicación

El número y proporción de axones mielínicos es similar a los controles. No se observan alteraciones en el espacio endoneurial, vasos, fibras amielínicas o epineuro. El nervio es considerado, bajo el punto de vista morfológico, normal.

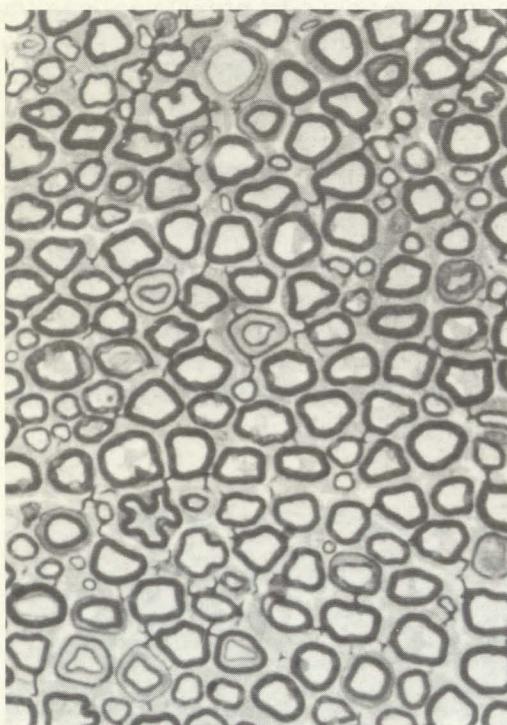


Fig. 6. 10 días de intoxicación por acrilamida. Ciático de rata $\times 800$.

b. A los 18 días de intoxicación

El número y proporción de axones mielínicos es aparentemente similar a los animales control, sin embargo se observan en algunas fibras aisladas procesos de degeneración axonal en sus diversos estadios. Ocasionalmente se observa algún axón globulizado, con material denso en su interior, posiblemente neurofilamentos. No se observan fibras demielinizadas o remielinizadas, los vasos son normales y el número y configuración de las fibras no mielínicas es normal. El espacio endoneurial es normal y no se observan células inflamatorias o macrófagos. El número de células de Schwann es similar a los controles. Patológicamente los hallazgos en el nervio son sugestivos de neuropatía axonal de moderada intensidad.

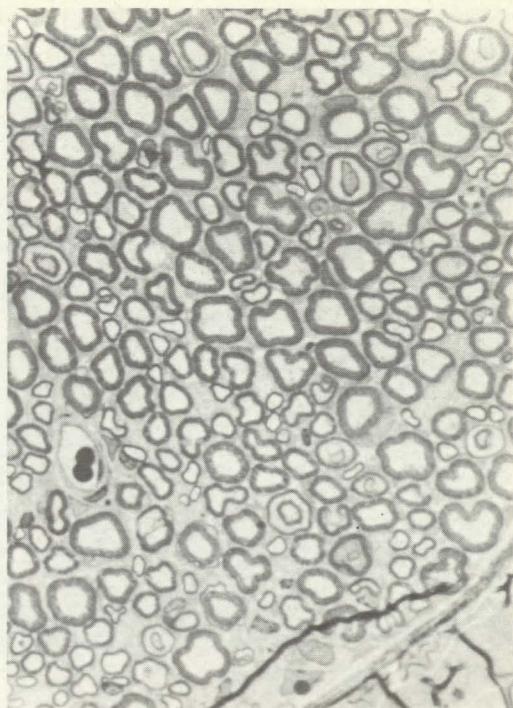


Fig. 7. 18 días de intoxicación por acrilamida. Ciático de rata $\times 800$.

c. A los 25 días de la intoxicación

Durante el periodo clínico de la enfermedad el nervio ciático presentaba una moderada disminución del total de fibras mielínicas, siendo esta disminución predominantemente marcada en el número de fibras de mayor calibre. Las fibras amilínicas estaban en concentraciones normales. El espacio endoneurial estaba distendido, y numerosas fibras se encontraban en diversos estadios de degeneración axonal.

La proporción de fibras distróficas por fascículo era variable entre fascículo y fascículo, incluso en el mismo animal, siendo aproximadamente entre el 5 y el 20% de las fibras. Las fibras distróficas presentaban opacización del axoplasma, retracción del axolema, invaginación de procesos adaxonales de la célula de Schwann circundando el axón distrófico o rodeando material denso intraaxonal con objeto de fagocitarlo, desdoblamiento de las capas circundantes de mielina, globos mielínicos y restos mielínicos en el interior de células de Schwann o macrófagos circundantes.

Una pequeña proporción de fibras, alrededor del 1-2% del total, presentaban enormes dilataciones de su axón, el cual tenía una alta concentración de material denso en su interior. Este material denso estaba

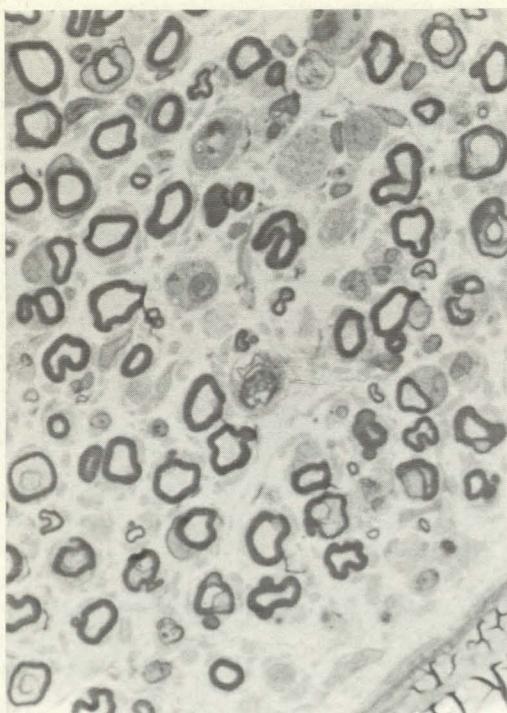


Fig. 8. 25 días de intoxicación por acrilamida. Ciático de rata $\times 800$.

constituido fundamentalmente por neurofilamentos y un número anormalmente grande de cuerpos densos axonales, mitocondrias, cuerpos multivesiculares y pequeñas vesículas, que parecían estar relacionadas con el retículo sarcoplásmico liso. Por el contrario, el número de neurotúbulos en estas dilataciones axoplásicas era normal o proporcionalmente muy disminuido en comparación con el número de neurofilamentos. Gránulos, rodeados o no de una membrana también eran frecuentes.

Las dilataciones axonales estaban siempre situadas en la zona más proximal paranodal. La zona distal paranodal en estos casos estaba distrófica, presentando una abundante concentración de mitocondrias y otras organelas, frecuentemente rodeadas por perfiles membranosos complejos, que en ocasiones parecían provenir del citoplasma adaxonal de la célula de Schwann. En algunas fibras, en las cuales era evidente que había ocurrido una total degeneración distal, se observaban ovoides de mielina y bandas de Bungner, indistinguibles de las que aparecen tras degeneración walleriana.

La mielina en algunas zonas paranodales, y principalmente en los axones dilatados estaba retraída y apelotonada, estando el axolema paranodal completamente desmielinizado.

En este estadío de la intoxicación no se observaron fibras desmielinizadas.

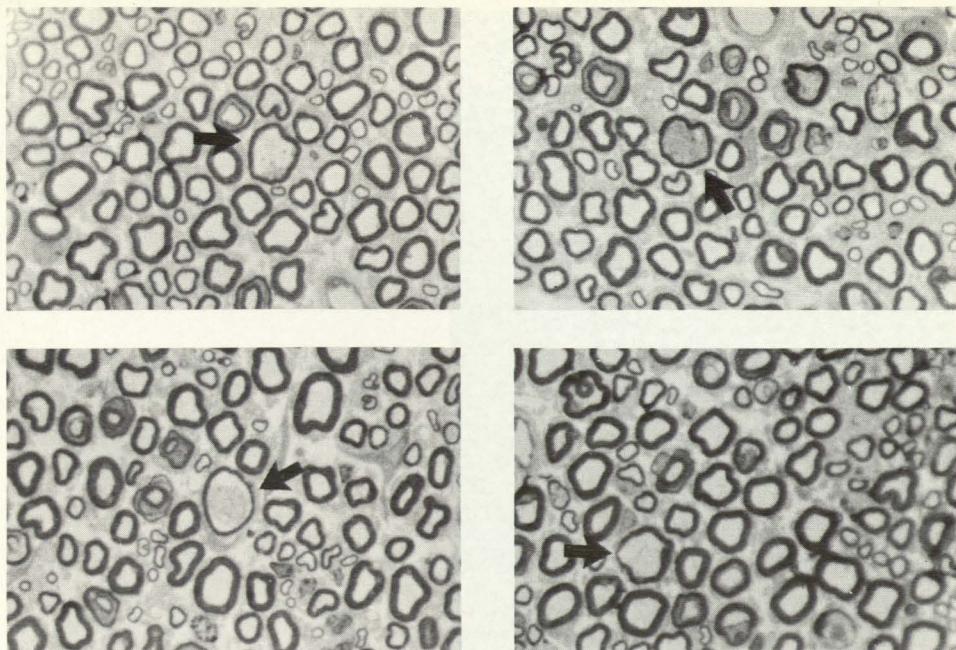


Fig. 9. Diferentes instancias de ensanchamiento axonal durante el periodo clínico de la neuropatía. Ciático de rata $\times 800$.

zadas con normalidad del axón, fibras remielinizadas o racimos de fibras mielínicas de pequeño calibre sugestivas de regeneración axonal. Los vasos, de pequeño y mediano calibre, presentes en el nervio, no presentaban anormalidades.

d. A los 20 post-cesación de la intoxicación

Los hallazgos en el nervio durante este estadio eran muy similares a los hallazgos durante el periodo clínico de la enfermedad, aunque más variables entre los animales entre sí. El número de fibras distróficas era similar al encontrado en el grupo anterior, entre un 5 y un 20%, y los estadios de degeneración axonal seguían presentes. No se observaron regeneraciones axonales, esto es, racimos de fibras mielínicas de pequeño calibre. El número de fibras ensanchadas era algo menor que durante el periodo clínico, pero en los casos presentes, las características de éstas eran similares a las descritas en el grupo anterior.

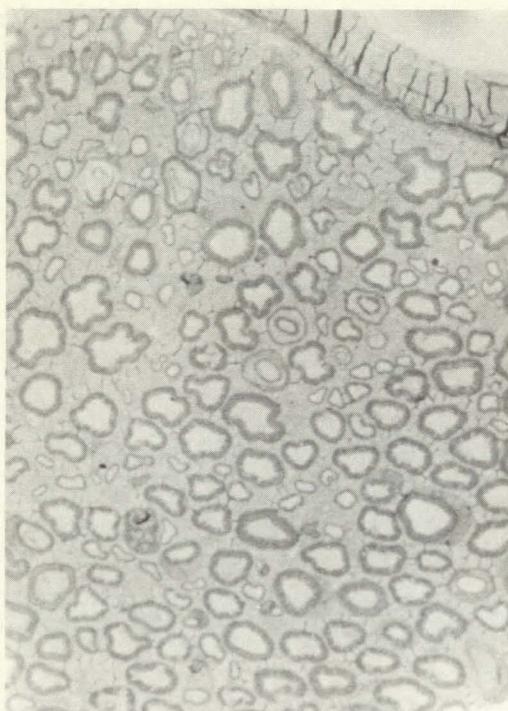


Fig. 10. 20 días post-intoxicación por acrilamida. Ciático de rata $\times 800$.

e. A los 30 días post-cesación de la intoxicación

En este grupo de animales el endoneuro no aparecía distendido, y la concentración de fibras mielínicas aparecía normal. El número de fibras distróficas presentes estaba reducido, siendo inferior al 5% en la mayoría de los casos. Los estadios de degeneración axonal observados eran siempre los finales, esto es homogeneización de la mielina en la zona ocupada anteriormente por el axón, globos mielínicos y macrófagos alrededor de la fibra con un citoplasma abundante en material denso, organelas, lisosomas, perfiles tubulares y circulares y restos mielínicos.

A pesar de ser 30 días los transcurridos desde la cesación de la intoxicación, no se observó más que en dos ocasiones racimos de fibras mielínicas de pequeño calibre regeneradas. Sin embargo, no se observó ninguna fibra con ensanchamiento paranodal, similar a las presentes en los dos grupos anteriores de animales.

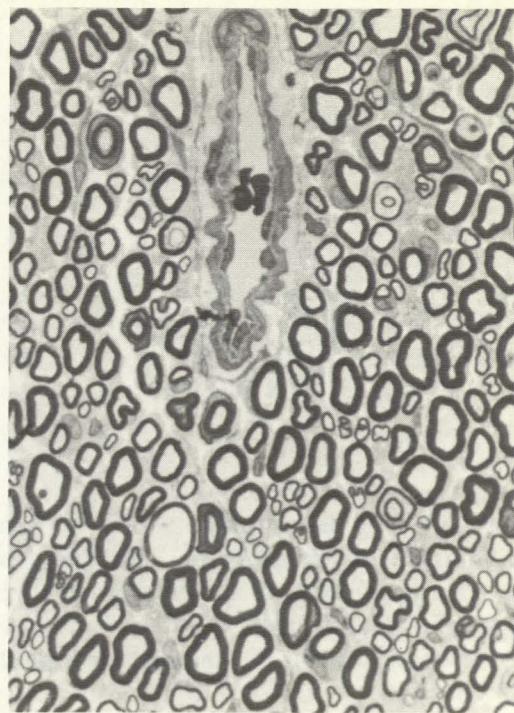


Fig. 11. 30 días post-intoxicación
por acrilamida. Ciático de rata $\times 800$.

DISCUSION

El experimento previo de estudio del patrón de acumulación del enzima acetil-colín-esterasa (AChE) en los segmentos inmediatamente proximal y distal a una ligadura única en el nervio ciático de la rata, demostró el transporte bidireccional del enzima, que se acumula de una forma lineal y progresiva en el segmento inmediatamente proximal a la ligadura durante al menos 24 horas. La acumulación en el sentido retrógrado fue también progresiva, pero únicamente lineal durante las primeras 6 horas. Durante las siguientes horas su acumulación no fue lineal, y en las últimas 12 horas del experimento su acumulación fue mínima. Esto fue interpretado como debido al agotamiento del enzima situado distalmente en los terminales nerviosos.

En los animales intoxicados la acumulación en sentido ortógrado siguió el mismo patrón que en los animales sanos, aunque la cantidad de AChE acumulada en las 24 horas fue un 25% inferior. La disminución de la cantidad acumulada es debido al efecto simultáneo de un menor transporte del enzima por 24 horas, y a una menor velocidad aparente de transporte. El decremento en la cantidad de AChE transportada en 24 horas es posiblemente debido a interferencia de la acrilamida con los mecanismos de síntesis proteica (Schotman y cols., 1978). En el segmento distal a la ligadura, el patrón de acumulación fue similar al de los animales sanos, siendo lineal y progresivo las primeras seis horas, decayendo algo en las seis siguientes, y siendo nulo en las 12 últimas horas del experimento. La cantidad total transportada en 24 horas fue un 29% inferior a los animales control. Las mismas causas que producen la disminución de la cantidad de enzima acumulada en 24 horas en sentido ortógrado son las responsables de la disminución de la actividad enzimática total acumulada en 24 horas en sentido retrógrado, esto es, disminución de la síntesis proteica y menor velocidad aparente de transporte.

El porcentaje de enzima que vuelve en sentido retrógrado al cuerpo de la

neurona es aproximadamente un 48% del transportado en sentido ortógrado, posiblemente para su reciclamiento o destrucción en los lisosomas. En los animales intoxicados, sólo un 38% del enzima es recuperado en sentido retrógrado. La causa puede radicar en acumulaciones del enzima en los preterminales nerviosos dañados o en una posible mayor destrucción en los terminales nerviosos distróficos.

Varias conclusiones, importantes para el siguiente experimento de estudio del transporte en los diferentes estadios de la intoxicación por acrilamida, fueron obtenidas. El periodo máximo de mantenimiento de la ligadura doble debía ser de 6 horas, ya que a partir de entonces, la acumulación no lineal provocaría datos falsos a partir de las fórmulas descritas en la sección Material y Métodos. El estudio preliminar no fue prolongado más de 24 horas, ya que a partir de las mismas el tramo distal del nervio comienza a sufrir degeneración walleriana (Thomas y cols., 1972), lo cual hubiera producido unos cálculos de transporte alejados de los fisiológicos. La no diferencia en la concentración de AChE en los diferentes tramos del nervio contralateral no ligado indica que su transporte es estable y homogéneo a lo largo del nervio. Si su actividad decayera a lo largo del tronco nervioso, indicaría una utilización del enzima a lo largo de la fibra que invalidaría los cálculos obtenidos a través de las fórmulas descritas.

En el estudio del transporte axoplásmico por medio del método de la doble ligadura, los animales control exhibieron una velocidad en sentido ortógrado de 453 ± 51 mm/24 horas, similar a la encontrada en otros mamíferos o aves (Ranish y Ochs, 1972, Brimijoin y Wiermaa, 1978, Couraud y DiGiamberardino, 1980) por las técnicas de inyección de precursores en los ganglios dorsales, autorradiografía o sección nerviosa. La AChE es transportada en sentido retrógrado a una velocidad de 181 ± 34 mm/24 horas, estadísticamente similar a la encontrada por anteriores autores. La proporción de enzima móvil es de un $4.26 \pm 1.02\%$ en sentido ortógrado y de un $3.79 \pm 1.02\%$ en sentido retrógrado. El resto de la actividad enzimática encontrada es debida a la fracción estacionaria del enzima, probablemente localizada en el axolema. La posibilidad de que la fracción transportada, posiblemente el enzima a utilizar para la transmisión sináptica en el terminal nervioso, sea estructuralmente diferente a la fracción estacionaria, con diferentes coeficientes de sedimentación, es controvertida y un estudio en el momento presente (Couraud y DiGiamberardino, 1980).

En los animales intoxicados, la cantidad de enzima transportado en 24 horas disminuye de forma estadísticamente significativa ya a los 18 días de intoxicación, manteniéndose en los mismos niveles a lo largo de la enfermedad. Una vez retirado el tóxico se produce un aumento también significativo de enzima transportado, posiblemente por mecanismo compensatorio de incremento de la síntesis proteica en el cuerpo neuronal en el proceso de regeneración de la fibra nerviosa dañada. Sin embargo, a pesar de

que estadísticamente el decremento de la actividad transportada es significativo, es poco probable que la disminución de la síntesis proteica que la acrilamida produce en el cuerpo neuronal sea la causa de la neuropatía. La metilen-bisacrilamida interfiere en similar modo que la acrilamida con la síntesis proteica en todos los tejidos y, sin embargo, no es neurotóxica. Schotman y cols. (1978) y Griffin y cols. (1977) demostraron una defectuosa regeneración nerviosa en animales intoxicados por acrilamida, con acumulación del material transportado en el terminal nervioso dañado. Estos autores atribuyeron a una deficiente utilización del material transportado la causa de la defectuosa regeneración. La disminución total de material transportado en 24 horas, demostrado en este experimento, contribuye posiblemente a esta anormalidad en la regeneración.

La fracción móvil del enzima aumentó lentamente durante el estadio preclínico de la intoxicación, llegando a ser un $5.72 \pm 2.23\%$ del total a los 25 días de la enfermedad y volvió a aumentar ligeramente una vez retirado el tóxico. Sin embargo, estas variaciones no son estadísticamente significantes. La técnica de la doble ligadura, hasta ahora la única que permite conocer la fracción móvil del enzima, no es suficientemente sensitiva para conocer variaciones en la concentración de la pequeña fracción móvil menores de 2 desviaciones estandar de la concentración control.

La velocidad absoluta de transporte en sentido ortógrado disminuyó significativamente ($p < 0.02$) un 13% en el periodo preclínico, un 18% durante el estadio clínico y siguió estando disminuida un 14% 20 días después de cesar la administración de acrilamida. La disminución del transporte axoplásico durante el estadio preclínico, en el cual el animal no presenta signos externos de la enfermedad, y el estudio morfológico del nervio, indican que sólo una mínima parte de las fibras están estructuralmente afectadas, lo que es altamente sugestivo de que la acrilamida ejerce acción tóxica sobre los mecanismos axonales de transporte rápido, y que esta acción tóxica se mantiene a lo largo de la intoxicación y tarda al menos 20 días en remitir una vez retirado el tóxico. Posiblemente esto último debido a una lenta eliminación fisiológica de la toxina, a una lenta reversibilización del defecto metabólico producido, o a la lenta regeneración nerviosa de los axones distróficos observados en este periodo post-intoxicación.

La cantidad transportada en sentido retrógrado durante los periodos preclínico, clínico e inmediatamente postclínico está significativamente disminuida. Ello es posiblemente debido a dos factores: por un lado, es posible que la cantidad que se transporta de manera retrógrada guarde una cierta proporcionalidad con la cantidad transportada de manera ortógrada, relativamente independiente de su utilización en los terminales nerviosos, y que dependa de la concentración de moléculas de acetilcolinesterasa en los terminales, que deben ser reprocesadas en el cuerpo neuronal. Por ello, si durante la intoxicación hay una menor cantidad de moléculas de AChE que

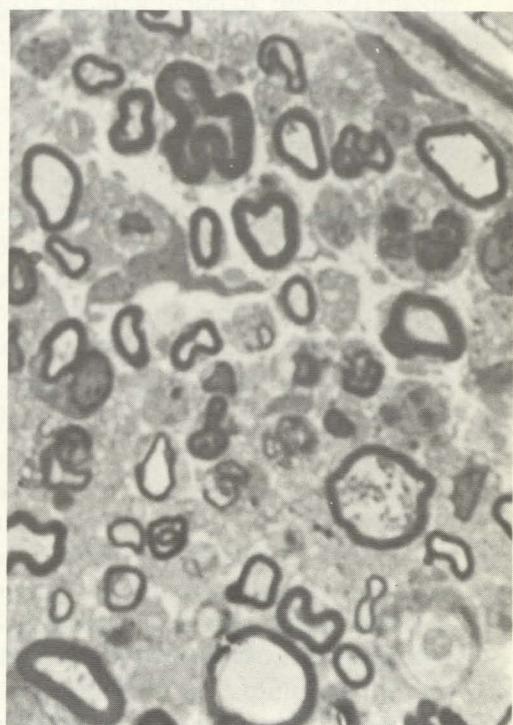
son transportadas a la periferia, la cantidad de moléculas que vuelven al soma neuronal es también menor. Por otra parte, el porcentaje del total de actividad enzimática acumulada en 24 horas en sentido retrógrado, con respecto al acumulado en sentido ortógrado, disminuyó de un 47% en el periodo preclínico, similar a los controles, a un 38% a los 20 días de haber cesado la intoxicación. Ello es quizá debido al hecho de la presencia durante ese estadio de abundantes axones distróficos. Algunos totalmente degenerados distalmente, y otros con ensanchamientos en las zonas paranoiales, con acumulación de neurofilamentos y otras organelas, que posiblemente dificultan el transporte retrógrado de sustancias en dirección al soma neuronal. Aunque en los estudios morfológicos simultáneos a los del transporte, el número de fibras distróficas, degeneradas o ensanchadas, no es enormemente grande, incluso durante el periodo clínico de la enfermedad, hay que tener en consideración que la zona estudiada corresponde al tronco ciático. La neuropatía producida por la acrilamida es una neuropatía distal (*dying-back neuropathy*) en la cual, la zona de la fibra nerviosa que primero se afecta es la de los preterminales nerviosos, a la que sigue la degeneración distal del terminal nervioso (Shacumburg y cols., 1974). Por ello es de suponer que aunque a nivel del tronco ciático el número de axones distróficos no era extraordinariamente grande, resultaba significativo que en sus terminales nerviosos la alteración estructural era importante, y por ello posiblemente contribuyente a la disminución de la cantidad total de AChE recuperada en el segmento distal a la ligadura más distal en 24 horas.

La fracción móvil del enzima transportada en sentido retrógrado aumentó un 22% durante el periodo clínico de la enfermedad, y permaneció aumentada un 24% a los 30 días de haber cesado la intoxicación. Estas diferencias, sin embargo, no son estadísticamente significativas ($p > 0.02$, Student's t-test), y las mismas consideraciones hechas en la discusión de los resultados de la fracción móvil del enzima transportada en sentido ortógrado, pueden tenerse en cuenta en la valoración de estas cifras.

La velocidad absoluta de transporte retrógrado disminuyó un 17% durante el periodo preclínico de la enfermedad; esta disminución es ya estadísticamente significativa ($p < 0.02$, Student's t-test). Durante el periodo clínico fue de 136 ± 46 mm/24 horas, esto es, un 25% inferior a los controles. Se mantuvo en esos niveles en el grupo de animales estudiado a los 20 días de cesar la intoxicación, y volvió a cifras normales a los 30 días. Estos resultados sugieren que la acción tóxica de la acrilamida se ejerce también sobre los mecanismos axonales de transporte retrógrado, o alternativamente, que el mecanismo de transporte retrógrado está determinado metabólicamente por los mismos enzimas que el mecanismo de transporte ortógrado rápido, y la acrilamida puede estar afectando uno o varios de los enzimas comunes a ambos mecanismos. Además de esto, la proporción entre la velocidad absoluta en sentido retrógrado y la velocidad absoluta de transporte

ortógrado rápido, que en los animales control era de un 40%, en los animales intoxicados disminuyó durante el periodo clínico y el inmediato postclínico a un 35%, lo que pudiera indicar que añadido a la acción directa de la acrilamida sobre ambos mecanismos de transporte, haya una dificultad intrínseca al transporte de sustancias en sentido centrípeto hacia el soma neuronal. Esta dificultad añadida puede ser, de nuevo, la profunda anormalidad estructural que sufren distalmente las fibras nerviosas. Los múltiples ensanchamientos que sufren las zonas paranodales proximales de los preterminales nerviosos con acumulación de neurofilamentos, cuerpos multivesiculares y otras organelas, y la distrofia del axón distal al paranodo ensanchado, son posiblemente causas estructurales que retardan el transporte retrógrado de sustancias.

La razón por la que el transporte retrógrado se mantiene enlentecido 20 días después de haber cesado la intoxicación puede estar en el tiempo que las partes distales de los axones necesitan para recomponerse morfológicamente. Esto explicaría también el que la velocidad de transporte retrógrado a los 20 días, esté asimismo disminuida en su proporcionalidad con respecto a la velocidad de transporte ortógrado en el mismo tiempo de la neuropatía.



Figs. 12 y 13. 25 días de intoxicación por acrilamida. Diferentes fascículos en el mismo nervio ciático de rata presentan diferentes grados de afectación de sus fibras mielinicas $\times 1900$.

En suma, la acrilamida produce una alteración en los sistemas de transporte ortógrado rápido y retrógrado que ya es evidente en los días inmediatos a la aparición del cuadro clínico de la neuropatía. La alteración se acentúa durante el estadio clínico de la enfermedad y se mantiene parcialmente 20 días después de retirar el tóxico. Aunque la alteración en el sistema retrógrado de transporte puede ser debida en parte a la distrofia distal de las fibras, la alteración en el sistema ortógrado rápido está únicamente relacionada con la acción directa de la neurotoxina sobre el transporte.

La acrilamida puede ejercer su acción bien directamente sobre el soporte estructural del sistema de transporte, o bien sobre la energía que el sistema requiere para su funcionamiento.

a. Posible efecto sobre el soporte estructural del sistema

La vincristina y la colchicina se unen a la tubulina de los microtúbulos impidiendo su polimerización. Ambas drogas producen una alteración en el transporte rápido (Green y cols., 1977). Rasool y Bradley (1978) encontraron una disminución del 75% en la capacidad de la tubulina para unirse a la colchicina, en ratas tratadas con acrilamida. En número de fibras distróficas, por ello carentes de microtúbulos, era del 5%, por lo que sugirieron que la acrilamida podría alterar las propiedades biofísicas de la tubulina sin llegar a despolimerizarla, pero suficientes como para impedir el transporte rápido. No ha habido otro estudio confirmatorio del anterior, sin embargo, es cuestionado el hecho de que los microtúbulos sean estrictamente necesarios para el transporte axoplásmico rápido (Byers, 1974) y que la acción de la colchicina sobre el transporte rápido sea debida a la desorganización de los microtúbulos. Otros componentes estructurales del sistema de transporte axoplásmico son menos conocidos, y la posible acción de la acrilamida sobre ellos es solamente especulativa en estos momentos.

Savolainen (1977) ha sugerido que la acrilamida, y posiblemente otras neurotoxinas como los hexocarbonos y el bisulfuro de carbono, pueden ejercer su acción tóxica por medio de su unión a los neurofilamentos, afectando sus propiedades y funciones naturales en el axón, que en estos momentos son desconocidas. El triplete proteico constituyente de los neurofilamentos sería denaturado durante su transporte a lo largo del axón en el sistema de transporte lento, y eventualmente al llegar a un cierto nivel de denaturación serían incapaces de ser transportados. Los neurofilamentos expuestos a la toxina durante períodos de tiempo más largos, esto es, los que son transportados hasta la zona distal del axón, serían los primeros afectados de este modo. Así, las proteínas de los neurofilamentos, denaturadas, incapaces de atravesar el nodo axonal se acumularían en el paranodo proximal ensanchándolo y posiblemente interrumpiendo el transporte axo-

plásмico. Con el tiempo neurofilamentos en regiones más proximales serían similarmente afectados y aparecerían ensanchamientos paranodales en regiones más proximales del axón. Sin embargo, hasta ahora no se ha podido relacionar los neurofilamentos con el soporte estructural y las funciones del sistema de transporte, por lo que el enlentecimiento de la velocidad de transporte producido por la acrilamida, cuando no existen aún en esa porción de ciático abundantes fibras distróficas, hace suponer que la acrilamida ejerce la acción a otro nivel, independiente de que pueda tener un efecto denaturalizante sobre las proteínas constituyentes de los neurofilamentos.

b. Efectos sobre el ciclo energético

La segunda posibilidad es que la acrilamida interfiera la función de enzimas participantes en el ciclo de obtención de energía requerida para el transporte energético. El tejido nervioso utiliza peculiarmente glucosa como fuente de ATP, y el transporte axoplásмico rápido requiere ATP obtenido a través de glicolisis (Sabri y Ochs, 1972). Ochs y cols. (1971) produjeron «*in vitro*» un bloqueo del transporte axoplásмico rápido por medio de ácido iodoacético (AIA) en nervio ciático de gato. La disfunción de este sistema de transporte ocurrió de manera gradual, con su total bloqueo a las 1.5-2 horas, atribuido a la inhibición específica e irreversible de la gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAFDH), enzima clave en el proceso de glicolisis. La adición de piruvato a la preparación de nervio bloqueado restauró el transporte.

Posteriormente, Sabri y Ochs (1972) demostraron que el bloqueo de la glicolisis en nervio periférico producida por AIA reducía en un tiempo de 1.5-2 horas los niveles de ATP y creatina fosfato a aproximadamente la mitad de los niveles presentes en los nervios control. La correlación entre el tiempo en que ocurrió el bloqueo del transporte y el tiempo en que ocurrió la caída de los niveles del fósforo de alta energía demostró que el sistema de transporte rápido necesita para su funcionamiento de la energía, y que ésta es obtenida a través de la glicolisis.

La acrilamida es un potente reagente de proteínas que se combina con los grupos sulfidrilos de la cisteína produciendo, después de hidrólisis, S-carbosietilcisteína (Hashimoto y Aldridge, 1970), y es posible que pueda bloquear de esta forma diferentes enzimas celulares relacionados o no con los ciclos de producción de energía. La acrilamida, así como otros neurotóxicos como los hexocarbonos y el bisulfuro de carbono, inhibe «*in vitro*» la fosfofructoquinasa, en forma cristalina o en homogeneizados cerebrales (Sabri y Spencer, 1979), y la inhibición podía ser prevenida por la previa adición a la preparación de DDT, lo que sugiere que la inhibición del enzima está relacionada con los grupos sulfidrilos de la fosfofructoquinasa. Una vez que

la inhibición se había establecido, el DDT no restauraba la actividad enzimática.

La acrilamida inhibe también «in vitro» la GAFDH obtenida de homogeneizado de cerebro y de nervio ciático, en forma directamente proporcional al periodo de incubación (Sabri y Spencer, 1979), así como la enolasa específica del tejido nervioso, «in vitro» e «in vivo» (Vyas y cols., 1979). Los tres enzimas son importantes eslabones en la cadena de glicolisis. Por otro lado, la acrilamida no ejerce efecto inhibitorio sobre la lactatodehidrogenasa (Sabri y Spencer, 1979) lo que refuerza la noción de especificidad de inhibición de enzimas más directamente relacionados con la obtención de energía en la neurona. Otro importante eslabón en la cadena energética, la respiración mitocondrial, no es afectado por la acrilamida (Hashimoto y Aldridge, 1970).

Hay, pues, una suficiente información indirecta que sugiere que la acción tóxica de la acrilamida esté relacionada con la depleción de energía proveniente de la glicolisis en las neuronas. El axón nervioso, con una superficie miles de veces mayor que el cuerpo neuronal, puede ser, de esta forma, la parte celular de la neurona más expuesta a la acción tóxica, y su total dependencia del soma neuronal para la obtención de los enzimas energéticos lo hacen más vulnerable. Es, pues, razonable pensar que la interferencia de la acrilamida con el transporte axoplásico rápido y con el retrógrado, se debe a la inhibición por el tóxico de los enzimas que este transporte necesita para la obtención de energía.

Es ilógico pensar que esta inhibición enzimática esté restringida al sistema nervioso, y posiblemente el tóxico ejerce su acción sobre todas las células del organismo. La especial sensibilidad del tejido nervioso sobre otros órganos a este tóxico, y a otros como los hexocarbonos y el bisulfuro de carbono, puede radicar en el hecho de que el sistema nervioso es exclusivamente dependiente de glucosa como fuente de ATP, y utiliza hasta un 20% del total del oxígeno consumido por el organismo en estado basal. La demanda de energía del tejido nervioso, en proporción al peso del tejido, es mucho mayor que la de otros órganos (Lehninger, 1975). La extensa superficie del axón y su dependencia del soma, contribuyen a esta selectividad en la acción tóxica de la acrilamida y compuestos similares por el sistema nervioso.

PATOGENESIS DE LA DEGENERACION DISTAL EN LA NEUROPATHIA POR ACRILAMIDA

Basándose en la acción inhibitoria de la acrilamida, los hexocarbonos y el bisulfuro de carbono sobre diferentes enzimas del ciclo energético, Spencer y cols. (1979) sugieren un mismo mecanismo patogénico para estos tóxicos. Según su hipótesis, el bloqueo de estos enzimas en los lugares donde se utilizan provocaría en los nodos predistales, donde su utilización es mayor, un bloqueo del transporte y la acumulación de material en las zonas prenodales, y la posterior degeneración distal.

La idea presupone que los enzimas están protegidos del tóxico durante su transporte a lo largo del axón. Asimismo, el axón proximal no sufriría alteraciones evidentes en el transporte hasta que la intoxicación fuera ya clínicamente evidente debido a degeneración distal de la fibra.

En el presente estudio, a los 10 días de la intoxicación el transporte axoplásmico rápido era normal, lo que excluye la idea de que una anomalía en el transporte causa directamente la degeneración axonal. Sin embargo, a los 18 días de la intoxicación, cuando las alteraciones morfológicas de las fibras no son marcadas, el transporte axoplásmico está enlentecido. Las alteraciones presentes 20 días después de terminar la intoxicación pueden estar debidas a las alteraciones morfológicas de las fibras durante ese periodo, pero también a los efectos acumulativos tóxicos de la acrilamida y al tiempo que el soma neuronal necesita para renovar enzimas previamente bloqueados a lo largo de toda la fibra.

Básicamente el presente experimento no desmiente la hipótesis de Spencer y cols. (1979); sin embargo, favorece la idea de que una alteración en el transporte contribuye de manera importante a la degeneración distal.

Modificando parcialmente la hipótesis anterior, sugiero que el tóxico difunde desde los vasos al endoneuro, y de allí se introduce en la fibra a través de los nodos, en donde la protección de la célula de Schwann es menor. Allí compite con los enzimas del ciclo energético que están siendo transportados distalmente o que son requeridos en ese lugar, con lo que la transmisión nerviosa y la velocidad de transporte intraneuronal decaen. La disminución de la velocidad de transporte y el bloqueo de enzimas energéticos durante el transporte acrecienta el déficit enzimático y metabólico de las zonas más distales de la fibra. Los axones de mayor calibre y longitud, con mayores requerimientos metabólicos y energéticos, y mayor dependencia del sistema de transporte para la obtención de materiales serían los primeros en degenerar en cuanto sus demandas superaran la capacidad de síntesis y envío del soma; y los nodos preterminales, con una mayor necesidad en enzimas energéticos, los que presentarían los primeros cambios estructurales distróficos.

Si la intoxicación es mantenida, los cambios distróficos avanzarían proximalmente precedidos en los días inmediatamente anteriores de un mayor enlentecimiento de la velocidad del transporte, hasta alcanzar un cierto equilibrio entre la cantidad y rapidez de envío de enzimas y otros materiales por el soma y la cantidad de inactivación por unidad de tiempo de los enzimas energéticos por el tóxico. En este punto el soma neuronal sería capaz de mantener un axón proximal corto aunque con funciones de transmisión nerviosa y transporte axoplásico enlentecidas.

La acumulación de neurofilamentos, transportados por el sistema de transporte lento (Black y Lasek, 1980), en las zonas paranodales puede estar debida a la acción denaturante sobre ellos de la acrilamida, propuesta por Savolainen (1977) o a una acción de la acrilamida sobre el sistema de transporte lento todavía no demostrada y que podría ser dependiente del bloqueo de enzimas del ciclo energético, o bien a ambas posibilidades combinadas.

La destrucción de los neurofilamentos puede estar dificultada bien por la posible acción denaturante de la acrilamida, bien por la posible ausencia en regiones proximales de las proteasas específicas de los neurofilamentos, normalmente presentes sólo en los terminales nerviosos (Black y Lasek, 1980). La alteración mecánica de la acumulación de neurofilamentos en las regiones preterminales contribuiría a un bloqueo rápido del transporte en esas áreas y la rápida degeneración distal de la fibra una vez alcanzado ese total bloqueo.

Similaridad patogénica con otras neuropatías distales

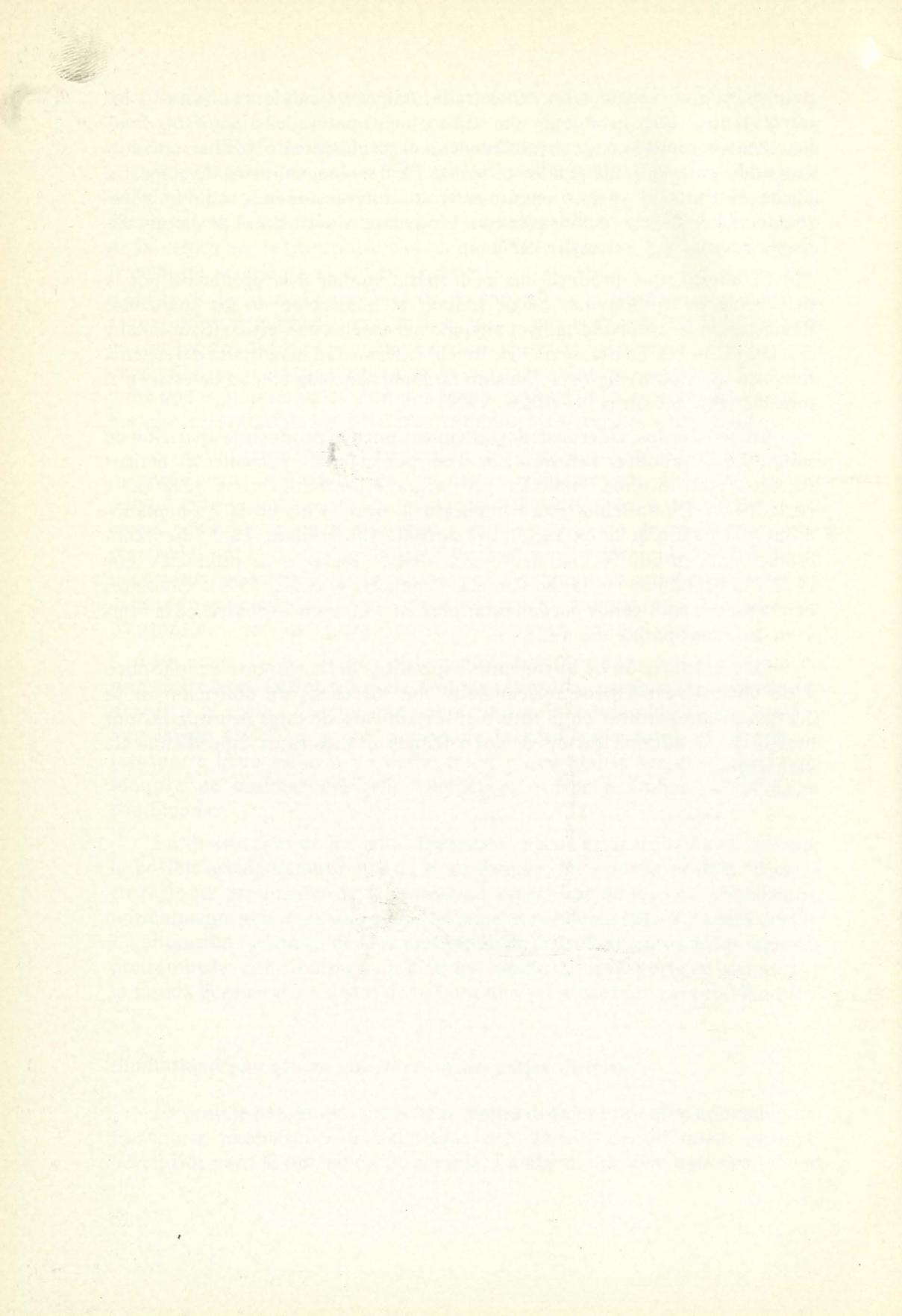
Es posible pensar que otras neuropatías distales presenten anomalías del transporte axoplásico relacionadas con déficits de diferentes enzimas necesarios para la obtención de energía. En algunas de ellas esta posibilidad

patogénica está cercana a ser demostrada. Así, por ejemplo, el arsénico y los nitrofuranos, que producen una típica neuropatía del tipo *dying-back* inactiva o compiten, respectivamente, con el pirofosfato de tiamina, cofactor requerido para la oxidación del piruvato. El arsénico, en forma de arsenato, puede sustituir al fósforo como sustrato, interaccionando con la glicerolaldehido-3-fosfato dehidrogenasa, bloqueando este paso de la glicolisis (Schoental y Cavanagh, 1977).

El talio, que produce una neuropatía similar a la producida por la deficiencia de riboflavina, puede inducir la deplección de los coenzimas flavínicos en la mitocondria, y el bloqueo del sistema energético (Schoental y Cavanagh, 1977). La ataxia de Friedreich, enfermedad hereditaria del sistema nervioso, de tipo *dying-back*, ha sido también asociada con un defecto en el metabolismo del piruvato (Blass, 1979).

En otros casos, enfermedades sistémicas pueden producir la aparición en sangre de metabolitos neurotóxicos. Así, por ejemplo, pacientes diabéticos tratados con insulina eliminan por orina etil-n-butil-cetona (Zlatkis y cols., 1973). En animales este compuesto se transforma en la 2,5-heptanodiona por medio de la oxidación del carbono subterminal. La 2,5-heptanodiona puede producir una neuropatía distal similar a la producida por la 2,5-hexanodiona y la acrilamida (Spencer y cols., 1979). Similares neurotóxicos endógenos pueden estar presentes en las neuropatías de la vejez y en las neuropatías urémicas.

La identificación de alteraciones específicas del transporte axoplásmico y de enzimas específicos relacionados con los ciclos de obtención de la energía puede permitir en el futuro el tratamiento de estas neuropatías por medio de la administración de los enzimas o substratos específicamente deficientes.



BIBLIOGRAFIA

- Asbury AK, Cox SC and Kanada D: ^3H -leucine incorporation in acrylamide neuropathy in the mouse. *Neurology* 23: 406, 1973.
- Asbury AK and Johnson PC: *Pathology of Peripheral Nerve*. Ed.: Asbury AK and Johnson PC. WB Saunders, Philadelphia, 1978.
- Black MM and Lasek RJ: Slow components of axoplasmic transport: two cytoskeletal networks. *J Cell Biol* 86: 616-623, 1980.
- Bradley WG: *Peripheral Neuropathies*. In: *Disorders of Voluntary Muscle*. Ed.: Walton JN. Churchill Livingstone, Edinburg, 1981, p: 753-784.
- Bradley WG and Jaros E: Axoplasmic flow in axonal neuropathies. II: Axoplasmic flow in mice whith motor neuron disease and muscular dystrophy. *Brain* 96: 247-258, 1973.
- Bradley WG and Williams MH: Axoplasmic flow in axonal neuropathies. I: Axoplasmic flow in cats with toxic neuropathies. *Brain* 96: 235-246, 1973.
- Blass JP: Disorders of pyruvate metabolism. *Neurology* 29: 280-286, 1979.
- Brimijoin S and Dyck PJ: Axoplasmic transport of dopamine- β -hydroxylase and acetylcholinesterase in human peripheral neuropathies. *Exp Neurol* 66: 467-478, 1979.
- Brimijoin S, Skau K and Wiermaa MJ: On the origin and fate of external acetylcholinesterase in peripheral nerve. *J. Physiol London* 285: 143-158, 1978.
- Brimijoin S and Wiermaa MJ: Rapid orthograde and retrograde axoplasmic transport of acetylcholinesterase characterized by the stop-flow technique. *J Physiol London* 285: 129-142, 1978.
- Byers MR: Structural correlates of rapid axoplasmic transport: evidence that microtubules may not be directly involved. *Brain Res* 75: 97-13, 1974.
- Cavanagh JB: The significance of the «dying-back» process in experimental and human neurological disease. *Int Rev Exp Path* 3: 219-267, 1964.
- Cavanagh JB and Chen FCK: Aminoacid incorporation in proteins during the «silent phase» before organo-mercury and p-bromophenyl-acetylurea neuropathy in the rat. *Acta Neuropath (Berl)* 19: 216-224, 1971.
- Couraud JY and DiGiamberardino L: Axoplasmic transport of the molecular forms of acetylcholinesterase in chick sciatic nerve. *J. Neurochem* 35: 1053-1066, 1980.

- DiGiambardino L and Couraud JY: Rapid accumulation of high molecular weight acetylcholinesterase in transected nerve. *Nature London* 271: 170-172, 1978.
- Droz B: Synthetic machinery and axoplasmic transport: maintenance of neural connectivity. In: *The Nervous System. The Basic Neurosciences*. Ed: Tower DB, Raven, New York, vol I, p: 111-127, 1975.
- Dumas M, Schwab ME, Baumann R and Thoenen H: Retrograde transport of tetanus toxin through a chain of two neurons. *Brain Res* 165: 354-357, 1979.
- Fink DJ and Gainer H: Retrograde axoplasmic transport of endogenous proteins in sciatic nerve demonstrated by covalent labeling in vivo. *Science* 208: 303-305, 1980.
- Fonnum F, Frizell M and Sjostrand J: Transport turnover of choline-acetyl-transferase and acetylcholinesterase in the vagus and hypoglossal nerves of the rabbit. *J Neurochem* 21: 1109-1120, 1973.
- Forman DS and Berenberg RA: Regeneration of motor axons in the rat sciatic nerve studied by labeling with axonally transported radioactive proteins. *Brain Res* 156: 213-225, 1978.
- Fullerton PM: Acrylamide toxicity in man. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 28: 426-430, 1970.
- Fullerton PM and Barnes JM: Peripheral neuropathy in rats produced by acrylamide. *British J Industr Med* 23: 210-221, 1966.
- Grafstein B: Axonal transport: the intracellular traffic of the neuron. In: *Handbook of Physiology. The Nervous System*. Bethesda. Am Physiol Soc. Sec 1, vol I, p: 691-717, 1977.
- Grafstein B and Forman DS: Intracellular transport in neurons. *Physiol Reviews* 60: p: 1167-1258, 1981.
- Grafstein B and McQuarrie IG: The role of the nerve cell body in axonal regeneration. In: *Neuronal Plasticity*. Ed: Cotman C, Raven, New York, p: 155-195, 1978.
- Green LS, Donoso JA, Heller-Bettinger IE and Samson FE: Axonal transport disturbances in vincristine-induced peripheral neuropathy. *Ann Neurol* 1: 255-262, 1977.
- Griffin JW, Hoffman PN, Clark AW, Carroll PT and Price DL: Slow axoplasmic transport of neurofilament proteins: impairment by $\beta_1\beta^1$ -iminodipropionitrile administration. *Science* 202: 633-635, 1978.
- Griffin JW, Price DL and Drachman DB: Impaired axonal regeneration in axonal neuropathy. *J Neurobiol* 8: 355-370, 1977.
- Gross GW: The microstream concept of axoplasmic and dendritic transport. *Adv Neurol* 12: 283-296, 1975.
- Guy J, Quigley HA and Anderson DR: The effect of biogenic monoamines on rapid axoplasmic transport in the rabbit optic nerve. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 17: 296-300, 1978.
- Hashimoto K and Ando K: Alteration of aminoacid incorporation into proteins of the nervous system in vitro after administration of acrylamide to rats. *Biochem Pharmac* 22: 1057-1060, 1973.
- Hashimoto K and Aldridge WN: Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochem Pharmac* 19: 2605-2607, 1970.
- Hoffman PN and Lasek RJ: The slow component of axoplasmic transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol* 66: 351-366, 1975.
- Kasa P: Acetylcholinesterase transport in the Central and Peripheral Nervous

- Tissue: the role of tubules in the enzymatic transport. *Nature London* 218: 1265-1267, 1968.
- Kuperman AS: The pharmacology of acrylamide. PhD Thesis. Cornell University. New York, 1957.
- Lasek RJ and Hoffman PN: The neuronal cytoskeleton, axonal transport and axonal growth. In: *Cell Motility*. Ed: Goldman R, Pollard T and Rosenbaum J. *Cold Spring Harbor Conf Cell Proliferation*, vol 3, p: 1021-1049, 1976.
- Lehninger AL: *Biochemistry*. Ed 2. Worth Publishers Inc. New York, 1975.
- Lowndes HE and Baker T: Toxic site of action in distal axonopathies. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Ed: Spencer PS and Schaumburg HH, Williams and Wilkins, Baltimore, p: 193-205, 1980.
- Lubinska L: Axoplasmic streaming in regenerating and normal nerve fibers. In: *Progress in Brain Research. Mechanisms of Neural Regeneration*. Ed: Singer M and Schade JP. Elsevier, Amsterdam, vol 13, p: 1-66, 1964.
- Lubinska L: On axoplasmic flow. *Int Rev Neurobiol* 17: 241-296, 1975.
- Lubinska L and Nimierko S: Velocity and intensity of bidirectional migration of acetylcholinesterase in transected nerves. *Brain Res* 27: 329-342, 1971.
- McLane JA and McClure WO: Rapid axoplasmic transport in dystrophic mice. *J Neurochem* 29: 865-872, 1977.
- Minckler DS, Bunt AH and Johanson GW: Orthograde and retrograde axoplasmic transport during acute ocular hypertension in the monkey. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 16: 426-441, 1977.
- Ochs S: Fasta transport of materials in mammalian nerve fibers. *Science* 176: 252-260, 1972.
- Ochs S: Energy metabolism and supply of $\sim P$ to the fast axoplasmic transport mechanism in nerve. *Fed Proc* 33: 1049-1058, 1974.
- Ochs S: A unitary concept of axoplasmic transport based on the transport filament hypothesis. In: *Recent Advances in Myology*. Ed: Bradley WG, Gardner Medwin D and Walton JN. *Excerpta Med*, Amsterdam, p: 189-194, 1975.
- Ochs S: Axoplasmic Transport. In: *Basic Neurochemistry*. Ed: Siegel GJ et al. Little, Borown and Company, Boston 1981, p: 425-442.
- Ochs S, Worth RM and Chan SY: Calcium requirement for axoplasmic transport in mammalian nerve. *Nature* 27: 748-750, 1977.
- Pleasure DE, Mischler KD and Engel WK: Axoplasmic transport of proteins in experimental neuropathies. *Science* 166: 524-525, 1969.
- Potter LT: *J Pharmacol exp Ther* 156: 500-506, 1967.
- Ranish N and Ochs S: Fast axoplasmic transport of acetylcholinesterase in mammalian nerve fibers. *J Neurochem* 19: 2641-2649, 1972.
- Rasool OG and Bradley WG: Studies on axoplasmic transport of individual proteins: I. Acetylcholinesterase in acrylamide neuropathy. *J Neurochem* 31: 419-425, 1978.
- Sabri MI and Ochs S: Relation of ATP and creatine phosphate to fast axoplasmic transport in mammalian nerve. *J Neurochem* 19: 2821-2828, 1972.
- Sabri MI and Spencer PS: Inhibition of glycolysis by chemically unrelated industrial neurotoxins which produce polyneuropathies. *Proc Internat Soc Neurochem* 7: 564, 1979.

- Sahenk Z and Mendell JR: Axoplasmic transport in zinc pyridinethione neuropathy: evidence for an abnormality in distal turn-around. *Brain Res* 186: 343-353, 1980.
- Sahenk Z and Mendell JR: Acrylamide and 2,5-hexanodione neuropathies: abnormal bidirectional transport in distal axons. *Brain Res* 219: 397-405, 1981.
- Samson F: Axoplasmic transport: the mechanisms and their susceptibility to derangement; anterograde transport. In: *The neurobiologic mechanisms in manipulative therapy*. Ed: Korr IM, Plenum, New York, p: 291-309, 1978.
- Savolainen H: Some aspects of the mechanisms by which industrial solvents produce neurotoxic effects. *Chemical-Biological Interactions* 18: 1-10, 1977.
- Schaumburg HH, Wisniewski HM and Spencer PS: Ultrastructural studies of the dying-back process. I. Peripheral nerve terminal and axon degeneration in systemic acrylamide intoxication. *J Neuropath exp Neurol* 33: 260-284, 1974.
- Schoenthal R and Cavanagh JB: Mechanisms involved in the «dying-back» process —an hypothesis implicating coenzymes. *Neuropath Applied Neurobiol* 3: 143-147, 1977.
- Schotman P, Gipon L, Jennekens FG and Gispen WH: Polyneuropathies and CNS metabolism. II: Changes in the incorporation rate of leucine during acrylamide intoxication. *Neuropath Applied Neurobiol* 3: 125-136, 1977.
- Schotman P, Gipon L, Jennekens FG and Gispen WH: Polyneuropathies and CNS metabolisms. III: Changes in protein synthesis rate induced by acrylamide intoxication. *J Neuropath exp Neurol* 37: 820-837, 1978.
- Specht SC: Axonal transport in the optic system of neonatal and adult hamsters. *Exp Neurol* 56: 252-264, 1977.
- Spencer PS, Sabri MI, Schaumburg HH and Moore C: Does a defect in energy metabolism in the nerve fiber cause axonal degeneration in polyneuropathies? *Ann Neurol* 5: 501-507, 1979.
- Spencer PS and Schaumburg HH: A review of acrylamide neurotoxicity. Part I: Properties, uses and human exposure. *Canad J Neurol Sci* 1: 143-151, 1974.
- Spencer PS and Schaumburg HH: A review of acrylamide neurotoxicity. Part II: Experimental animal neurotoxicity and pathologic mechanisms. *Canad J Neurol Sci* 1: 152-169, 1974.
- Spencer PS and Schaumburg HH: Central-peripheral distal axonopathy. The pathology of dying-back neuropathies. *Prog Neuropathol* 3: 253-295, 1976.
- Sumner A, Pleasure D and Ciesielka K: Slowing of fast axoplasmic transport in acrylamide neuropathy. *J Neuropath exp Neurol* 35: 319, 1976.
- Thomas PK, King RHM and Phelps AC: Electron microscopy observations on the degeneration of unmyelinated fibers following nerve section. *J. Anat* 113: 279, 1972.
- Tso MO and Hayreh SS: Optic disc edema in raised intracranial pressure. Axoplasmic transport in experimental papilledema. *Arch Ophthalmol* 95: 1458-1462, 1977.
- Tuček S: Transport of choline-acetyltransferase and acetyl-cholinesterase in the central stump and isolated segments of a peripheral nerve. *Brain Res* 86: 259-270, 1975.
- Vyas IL, Howland RD and Lowndes HE: Inhibition of rat brain and sciatic nerve enolase activity by acrylamide. *Soc Neurosci Abstracts* 5, 1423, 1979.
- Weiss PA: Neuronal dynamics and neuroplasmic («axonal») flow. *Symp Int Soc Cell Biol* 8: 3-34, 1969.

- Wooten GF and Cheng CH: Transport and turnover of acetyl-cholinesterase and choline-acetyltransferase in rat sciatic nerve and skeletal muscle. *J Neurochem* 34: 359-366. 1980.
- Zlatkis A, Bertsch W, Lichtenstein HA et al: Profile of volatile metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 17: 763-767, 1973.

FP