

241175



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

*Localización de los receptores a glutamato y  
aspartato en los diferentes tipos de neuronas  
de la retina.*

*Tesis que, para obtener el título de Biólogo,  
presenta*

**FRIDA M. G. SOMOHANO ERES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

**1984**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**INDICE:**

	<b>Página</b>
- <b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
- <b>Métodos</b> .....	<b>19</b>
- <b>Resultados</b> .....	<b>23</b>
- <b>Discusión</b> .....	<b>25</b>
- <b>Referencias</b> .....	<b>30</b>

## INTRODUCCION

Las células nerviosas tienen dos propiedades especiales que las hacen diferentes de las células de otros tejidos. La primera es su habilidad para conducir impulsos bioeléctricos a largas distancias sin ninguna pérdida en la fuerza de la señal. La segunda, directamente relacionada con la primera, es la de poseer conexiones específicas de entrada y salida, ya sea con otras células nerviosas o con tejidos inervados como músculos o glándulas. Estas conexiones determinan el tipo de información que recibe cada célula nerviosa, así como los tipos de respuesta que es capaz de dar.

La célula nerviosa está formada por el soma que es la parte que rodea al núcleo y por un número variable de terminaciones, desde una sola en la monopolar que es una vía eferente, el axón, hasta la multipolar que posee además de la anterior una serie de terminaciones eferentes más o menos ramificadas, las dendritas. Los axones establecen contacto con las dendritas o con los cuerpos celulares en puntos específicos conocidos como sinapsis, en los que se establece la comunicación interneuronal funcional.

La zona distal del axón presenta características distintivas como son mitocondrias y un gran número de vesículas pequeñas de forma esférica con un diámetro de 200 a  $1,200 \text{ \AA}$  que se han denominado vesículas sinápticas y que contienen moléculas de sustancias químicas consideradas como posibles transmisores. Los axones también pueden presentar en su trayecto acúmulos de vesículas en los que otras dendritas pueden establecer contacto sináptico; este tipo de contacto recibe el nombre de sinapsis "en passant" y su existencia indica claramente que el término sinap-

sis se ajusta más a un concepto funcional de comunicación que a una configuración anatómica determinada (Cooper y col., 1970).

La microscopía electrónica de las zonas sinápticas en el Sistema Nervioso Central revela la existencia de una zona de contacto especializada entre la terminación axonal y la región postsináptica. Esta zona de contacto está compuesta por material amorfo que recubre las porciones intercelulares de las membranas pre y postsinápticas, llenando la hendidura sináptica que existe entre las dos superficies en aposición. Tales formas de contactos especializados son comunes a varios tipos de células derivadas del ectodermo embrionario al igual que la célula nerviosa. Sin embargo, en el caso de la neurona, el material intracelular de la terminación presináptica presenta proyecciones densas que podrían desempeñar un simple papel de enlace entre zonas pre y postsinápticas específicas, o bien un mecanismo potencial para modular la transmisión sináptica en términos de su frecuencia de descarga.

La transmisión química entre las células nerviosas se lleva a cabo básicamente mediante la liberación de una sustancia transmisora que puede o no estar almacenada en vesículas de la terminación presináptica. Esta sustancia debe interactuar con un receptor específico en la zona postsináptica; esta interacción produce, a su vez, un cambio en la permeabilidad de la membrana al  $\text{Na}^+$ , al  $\text{K}^+$  o al  $\text{Cl}^-$ , y según el tipo de transmisor, ya sea excitador o inhibidor, el impulso eléctrico que viaja por el axón en forma de potencial de acción se transmite o se bloquea (Mc.Geer y col., 1978).

Puesto que este fenómeno de conducción nerviosa lleva implícita una interacción de la molécula transmisora con un sitio específico en la mem-

brana que es el receptor postsináptico, en los últimos años ha cobrado gran importancia el estudio de los receptores en las membranas. Así, se han estudiado entre otros, receptores a varias hormonas polipeptídicas, a catecolaminas, a la acetilcolina, a aminoácidos y a un creciente número de péptidos considerados como posibles transmisores en el Sistema Nervioso Central y Periférico, así como a hormonas esteroides, cuyos receptores no son membranales sino citoplásmicos.

Desde el punto de vista farmacológico, tanto la interacción hormona-célula blanco como la interacción neurotransmisor-membrana postsináptica pueden ser estudiadas con la misma técnica especializada, puesto que en ambos casos se trata de una interacción transmisor-receptor. Las características de esta interacción son (ver De Robertis, 1981):

1. Saturabilidad: dado que el número de sitios receptores es finito, la curva que representa la interacción ligando-receptor debe ser saturable (presentar una  $B_{max}$ ).
2. Reversibilidad: la interacción debe ser reversible dado que, por lo general, no es de tipo covalente.
3. Alta afinidad por el receptor: esto puede evaluarse por la habilidad de otros compuestos relacionados para desplazar al transmisor del receptor. La afinidad se expresa por la  $K_B$  que es la relación entre las constantes de disociación y de asociación: 
$$K_B = \frac{K_{disc.}}{K_{asoc.}}$$
4. Especificidad: la interacción debe presentar un cierto grado de especificidad farmacológica, que puede ser incluso de tipo estérico, es decir, preferente o absoluta para uno de los isómeros ópticos, y modificarse en presencia de compuestos agonistas y antagonistas de manera paralela a lo observado en preparaciones fisiológicas más íntegras.

En el sistema nervioso de los mamíferos, los compuestos más ampliamente aceptados como neurotransmisores, además de algunos aminoácidos como GABA, glicina,  $\beta$ -alanina y los ácidos glutámico, aspártico, cisteico y homocisteico, son la acetilcolina, las catecolaminas norepinefrina y epinefrina, así como la indolamina serotonina (5HT). El estudio de la acción de las catecolaminas a nivel sináptico ha ayudado grandemente a esclarecer el mecanismo de acción de drogas importantes que afectan el comportamiento, como son los antidepresivos, anfetaminas y tranquilizantes. Los estudios similares con 5HT han ayudado a aclarar el mecanismo de acción de las drogas psicotrópicas. Sin embargo, a pesar del interés clínico del estudio de las aminas biogénicas, su acción se restringe a un número pequeño de neuronas en el Sistema Nervioso Central. Hökfelt y col. (1970) calcularon que aproximadamente un 1% de las sinapsis del cerebro emplean norepinefrina como transmisor, aproximadamente el mismo porcentaje emplea dopamina y un número aún menor de neuronas emplea 5HT. McLennan (1970) estimó que los terminales que utilizan acetilcolina alcanzan solo un 10% de las sinapsis del cerebro.

Tomando en cuenta lo anterior, en términos cuantitativos los aminoácidos parecen ser los transmisores de acción más general en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos. De acuerdo con su actividad neurofisiológica, pueden distinguirse dos clases de aminoácidos: excitadores, como los ácidos glutámico, aspártico, cisteico y homocisteico, los cuales despolarizan a la mayor parte de las neuronas en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos, y aminoácidos inhibidores, como GABA, glicina y  $\beta$ -alanina, que hiperpolarizan la membrana de las células neuronales. De este último grupo, el GABA y la glicina son los candidatos más acepta

dos como neurotransmisores en el Sistema Nervioso Central. Así, Curtis y col. en 1968 demostraron que el GABA actúa a lo largo de todo el neurorje, mientras que la glicina sólo afecta a las neuronas de la médula espinal y tallo cerebral, pero no a las de la corteza cerebral.

Al caracterizar la interacción del transmisor con su receptor en la membrana, se ha podido obtener información acerca del número y distribución de los receptores a varios aminoácidos como GABA, glicina, ácido glutámico y  $\beta$ -alanina. El conocimiento de estas características es un arma importante para el esclarecimiento de la función que estos compuestos desempeñan en áreas específicas del Sistema Nervioso Central. Se ha podido comprobar que en las áreas en las que se ha estudiado, la densidad de los sitios de unión para GABA, glicina y ácido glutámico en membranas aisladas, es paralela a la distribución de su acción farmacológica.

La retina es un órgano ontogenéticamente derivado del diencéfalo, que se ha utilizado frecuentemente como un modelo para estudiar los mecanismos e interacciones que ocurren en el Sistema Nervioso Central debido a varios factores:

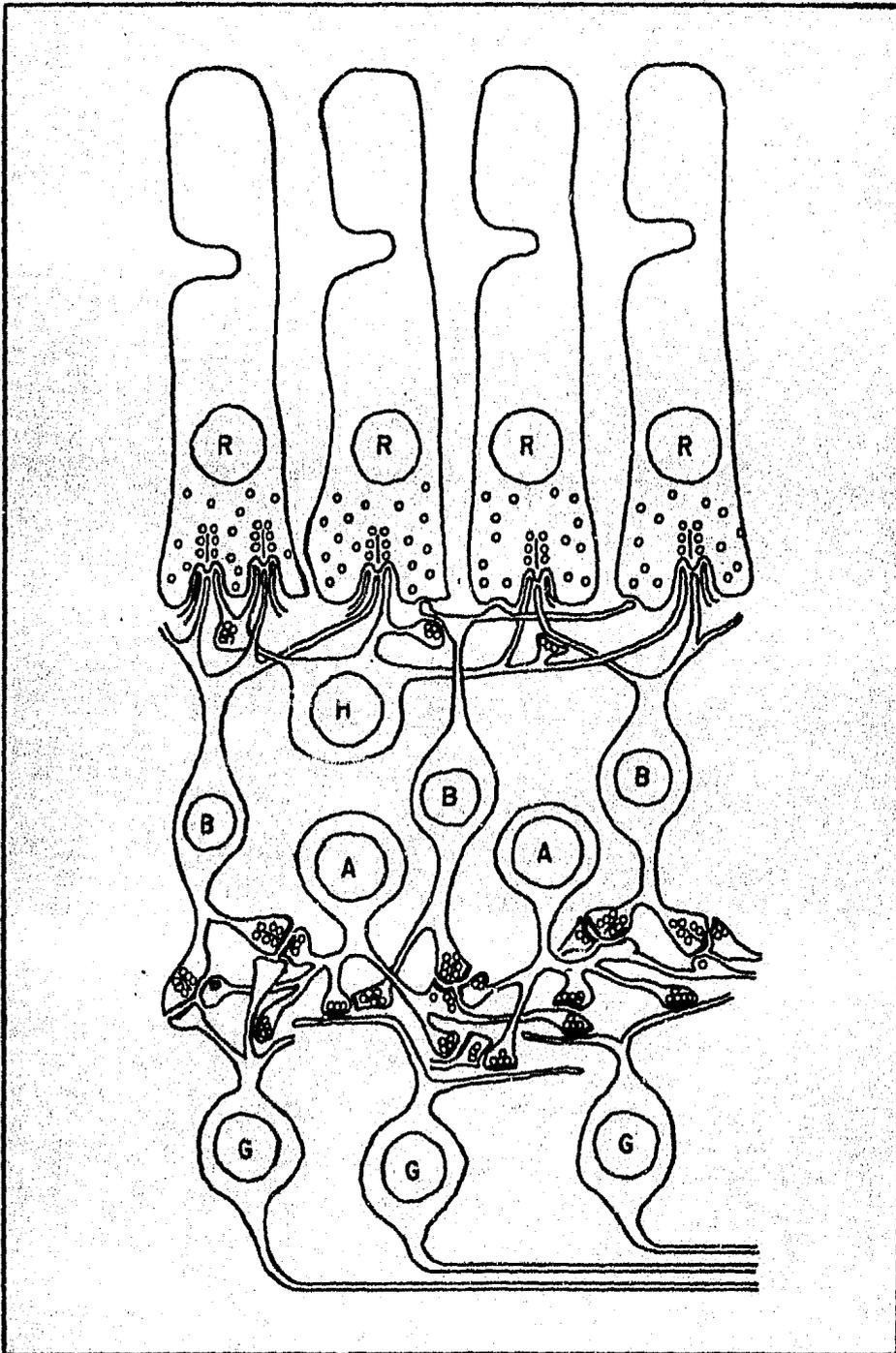
- a) Su accesibilidad, que permite diseccionarla rápidamente y conservarla en un medio artificial.
- b) La disposición de los distintos tipos celulares en capas definidas fácilmente diferenciables.
- c) La facilidad de estimulación de los diferentes tipos celulares por cambios en los patrones de iluminación.
- d) La facilidad de registro tanto de la actividad eléctrica de las células individuales, por registro intracelular, como de la retina completa

por registro en el nervio óptico in vitro.

La retina de los vertebrados está constituida por cinco tipos diferentes de neuronas: los fotorreceptores, las células horizontales, las amacrinas, las bipolares y las ganglionares (Figura 1). Histológicamente se observan tres capas celulares y dos zonas sinápticas que son la capa plexiforme externa y la interna. En la capa plexiforme externa hacen sinapsis las terminaciones procedentes de los fotorreceptores, que constituyen la primera capa celular, con las terminaciones de las células bipolares y horizontales, correspondientes a la segunda capa celular, dirigidas hacia el exterior. Las células bipolares y las amacrinas, cuyos somas se encuentran también en la segunda capa celular, establecen contacto en la capa plexiforme interna a través de las terminaciones de las células ganglionares que constituyen el tercer estrato celular y cuyos axones se prolongan para formar el nervio óptico. Además de los elementos neuronales, existe un tipo de célula glial, las células de Müller, que atraviesan la retina verticalmente en todo su espesor (Dowling, 1979).

El impulso nervioso que se genera en la capa de los fotorreceptores es transmitido en sentido vertical a través de las células bipolares y ganglionares hasta salir por el nervio óptico hacia centros superiores de integración. El impulso es modulado en sentido horizontal por las interneuronas inhibitoras horizontales y amacrinas.

Al estudiarse los potenciales de reposo de las células horizontales, se vio que, en comparación con otras neuronas, éstos son relativamente bajos en la oscuridad, del orden de -25 a -40 mV (Svaetichin y Mac Nichol, 1958). En la luz, estas células se hiperpolarizan hasta alcanzar valores semejantes a los del potencial de reposo de otras neuronas, entre -60 y



*Figura 1*

Diferentes tipos celulares en la retina: R: fotorreceptores ;  
H: células horizontales ; B: células bipolares ; A: células  
amacriñas y G: células ganglionares.

-80 mV, lo cual parece indicar que las células horizontales se encuentran parcialmente despolarizadas en la oscuridad, y con la luz disminuye esa despolarización. Con estos antecedentes, Trifonov propuso, en 1968, que las sinapsis de los fotorreceptores son tónicas, es decir, que liberan continuamente un neurotransmisor despolarizante, es decir, excitador, en la oscuridad disminuye o detiene la liberación del mismo. Hagins (1979) demostró que existe una corriente continua de entrada de sodio al fotorreceptor en la oscuridad y que la luz disminuye la conductancia a este ion en los segmentos externos del fotorreceptor, produciendo su hiperpolarización y que el transmisor deje de liberarse.

Los compuestos que se han propuesto como neurotransmisores en las distintas poblaciones celulares de la retina son: a nivel de los fotorreceptores, un compuesto de tipo excitador: acetilcolina, ácido glutámico o ácido aspártico; a nivel de las células horizontales, un compuesto inhibitorio que module la actividad de los fotorreceptores y de las bipolares: GABA; a nivel de las amacrinas, compuestos excitadores o inhibitorios, dependiendo de las distintas poblaciones de amacrinas, que modulen la actividad de las células bipolares: dopamina, acetilcolina, GABA, glicina o neuropéptidos; a nivel de las células ganglionares, el ácido glutámico, y a nivel de las células interplexiformes, cuya existencia se ha demostrado en peces y monos del nuevo mundo, dopamina (Gershenfeld y Piccolino, 1979).

Por lo que se refiere a las neuronas que liberan neurotransmisores excitadores como los fotorreceptores y bipolares, y especialmente en el caso de los fotorreceptores, Murakami y col. (1972) demostraron en experimentos fisiológicos que es poco probable que la acetilcolina sea el

neurotransmisor liberado, ya que casi no hay actividad de la enzima que la sintetiza, la acetilcolintransferasa, en la capa de los fotorreceptores y la acetilcolina tiene muy poco efecto sobre las células horizontales. En cuanto a los aminoácidos excitadores, es decir, el ácido glutámico y el ácido aspártico, existen evidencias principalmente fisiológicas que permiten considerarlos como los posibles transmisores a este nivel.

Werman en 1966 estableció 6 criterios básicos para que un compuesto pueda ser considerado como neurotransmisor:

1. Presencia: El transmisor propuesto debe estar presente en la neurona que lo produce y encontrarse potencialmente accesible para su utilización.
2. Existencia de enzimas determinantes en la síntesis del candidato a transmisor en la neurona que lo produce.
3. Identidad de acción: El transmisor propuesto debe inducir el mismo efecto en la célula postsináptica que el transmisor natural. Es decir, debe modificar la conductancia iónica de la membrana a través de los mismos mecanismos.
4. Liberación del transmisor: Durante la estimulación nerviosa, la sustancia transmisora debe ser identificada en el fluido extracelular de la región de la sinapsis activada.
5. Inactivación: Debe existir un sistema responsable de la eliminación del transmisor una vez efectuada su acción.
6. Identidad farmacológica: Los agentes que interactúan fisiológicamente con el transmisor natural deben interactuar en la misma forma con el transmisor propuesto.

Los ácidos glutámico y aspártico (Figura 2) se han postulado como

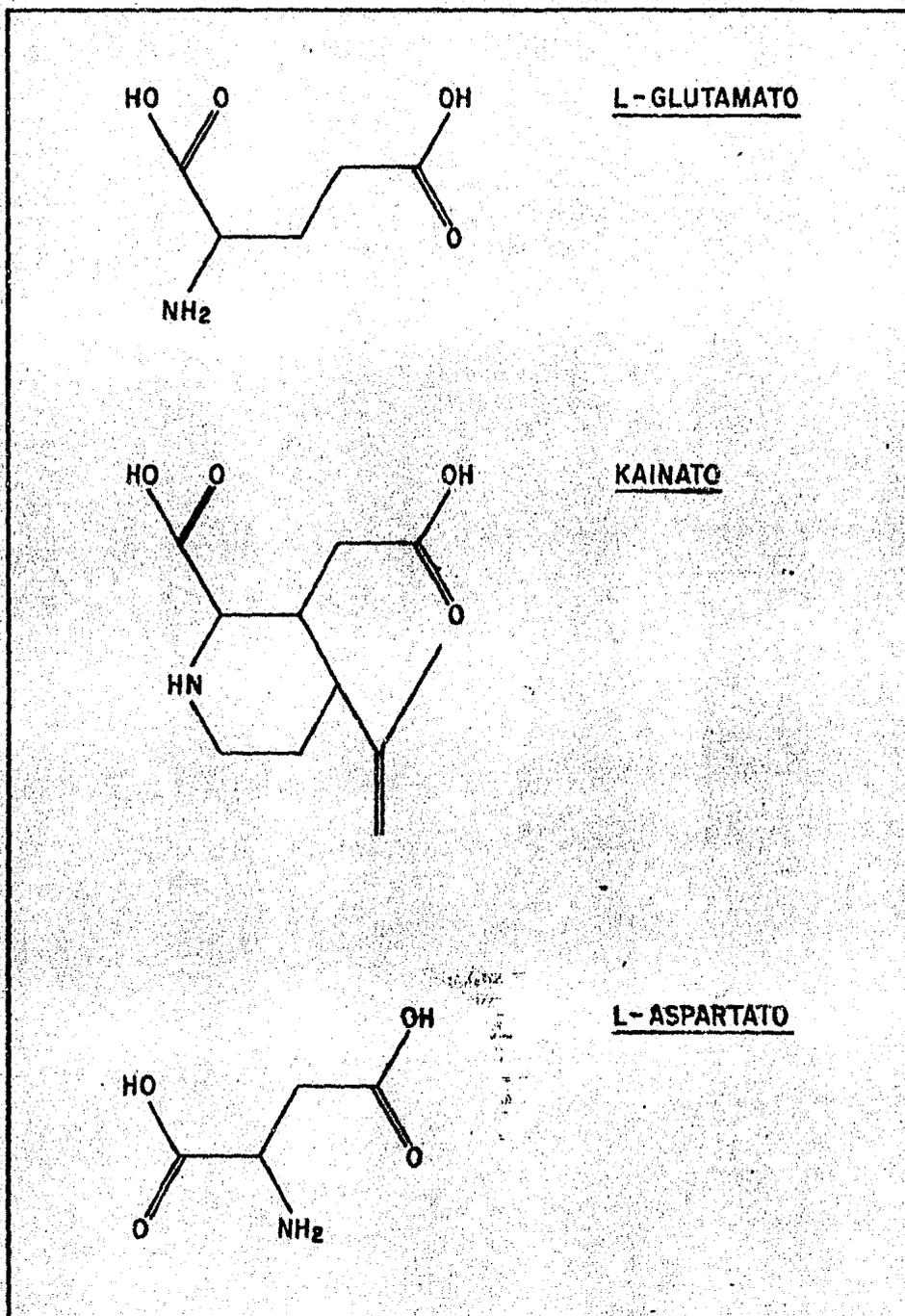


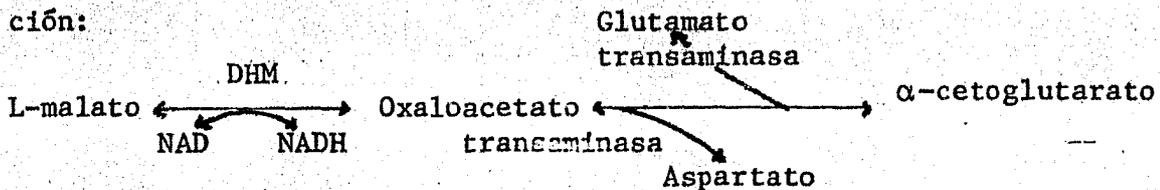
Figura 2

Análogos estructurales del ácido glutámico que se han propuesto como posibles neurotransmisores excitadores en la retina. En el caso del kainato, no éste directamente, sino una sustancia similar, es el posible candidato.

posibles transmisores excitadores en la retina debido principalmente a evidencia indirecta, sin embargo, cumplen varios de los criterios antes mencionados para considerarlos como transmisores:

Presencia: El ácido glutámico se encuentra en la retina de rata, rana y pollo en una concentración de aproximadamente 4  $\mu$ molas/gr, y el aspártico en una concentración de 0.2 a 1.5  $\mu$ molas/gr (Starr, 1973). Kennedy y Voaden (1974) encontraron que ambos aminoácidos se concentran preferentemente en las capas externas de la retina.

Neal y Atterwill, en 1974, comprobaron una alta actividad de la glutamato-aspartato transaminasa y de la deshidrogenasa málica en los segmentos internos de los fotorreceptores. Dado que el glutamato y el aspartato se sintetizan a partir de glucosa y otros precursores mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos por reacciones de transaminación:



la presencia de estas enzimas satisface uno de los criterios bioquímicos más importantes para postular a estos compuestos como neurotransmisores: que las enzimas de síntesis de los posibles neurotransmisores se encuentren concentradas principalmente en las terminales sinápticas.

Dowling y Ripps (1973), Murakami y col. (1972 y 1975), Cervetto y Piccolino (1974), Gershenfeld y Piccolino (1979) y otros investigadores mostraron evidencia electrofisiológica de que tanto el ácido glutámico como el aspártico tienen la capacidad de despolarizar a las células horizontales, bipolares y amacrinas como se esperaba en el caso de que estos compuestos fueran los transmisores liberados por los fotorrecepto

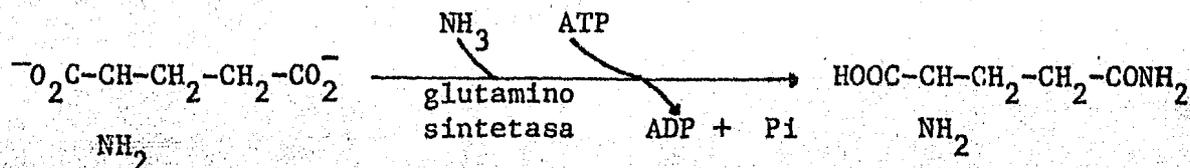
res y por las células bipolares, lo cual satisface el criterio de iden ti dad de acción del compuesto.

Desde el punto de vista bioquímico, Miller y Schwartz (1983) demo str aron recientemente, en una preparación de fotorreceptores, que el áci do glutámico y el ácido aspártico se liberan al estimular por alto pot asio en un medio con cobalto y sin calcio y que esta liberación aumenta al doble en un medio con 3 mM de  $Ca^{++}$  sin cobalto, lo cual corresponde a una liberación dependiente de  $Ca^{++}$ , característica de un neurotransmisor (Rubin, 1970). Por otra parte, Neal y col. (1979), en preparaciones fisiológicas de retina de conejo ("eye cups"), mostraron evidencia de que la liberación de ácido aspártico  $H^3$  disminuye al estimular la re tina previamente adaptada a la oscuridad con un fotoestimulador, lo que parece indicar que el ácido aspártico podría ser el neurotransmisor que se libera tónicamente del fotorreceptor en la oscuridad.

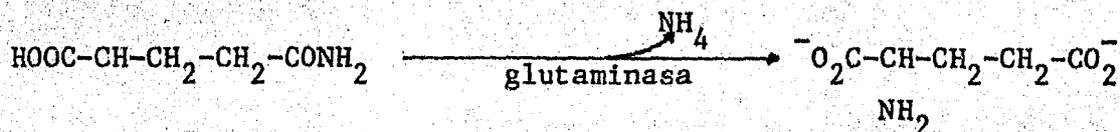
En cuanto a un sistema eficiente para la remoción del neurotransmiso ro del espacio sináptico, en 1971, Neal, y en 1976 Neal y White describie ron en la retina de rata un sistema de recaptación, dependiente de  $Na^+$ , con dos componentes cinéticos: uno de alta afinidad, con un valor de Km aparente de 21  $\mu M$  y uno de baja afinidad con una Km aparente de 0.63 mM. Por otra parte, Thomas y Redburn (1978) describieron en la re tina de conejo un sistema de recaptación dependiente de  $Na^+$ , también de alta afinidad, con una Km de 1 a 2  $\mu M$ . Estos sistemas son compartidos por el ácido glutámico y el ácido aspártico.

Desde el punto de vista metabólico, tanto el ácido glutámico como el aspártico participan en numerosas reacciones celulares como la síntesis de proteínas. Con base en los estudios de Van den Berg y col.

(1969, 1971 y 1973) con precursores marcados como glucosa C<sup>14</sup> y acetato C<sup>14</sup>, se piensa que existen dos compartimentos celulares de glutamato relacionados con el ciclo de Krebs: uno menor en el que el glutamato procedente del ciclo de Krebs se convierte en glutamina



y uno mayor al que pasa esta glutamina produciendo glutamato suplementario al de la poza metabólica procedente del ciclo de Krebs:



Por los estudios de Rose (1973), se piensa que la formación de la glutamina es un proceso que ocurre principalmente en la glía y que la transformación de ésta en glutamato ocurre en las neuronas y está directamente relacionada con el ácido glutámico liberable durante la neurotransmisión. Apoyando este criterio, White y Neal (1976) y Ehinger y Falck (1971) demostraron por radioautografía que el ácido glutámico y el ácido aspártico marcados se acumulan principalmente en las células gliales de la retina de rata y de conejo. Así, las células gliales podrían tener un papel importante en la remoción de estos aminoácidos de la terminal sináptica y en su reutilización a través de la glutamina para ser liberados nuevamente.

Desde el punto de vista farmacológico, la existencia de receptores postsinápticos para un compuesto se considera como evidencia su posible papel como neurotransmisor. López-Colomé (1981) caracterizó los receptores postsinápticos para ácido glutámico en ambas capas plexiformes de

la retina de pollo, encontrando para la retina completa una unión específica de ácido glutámico  $H^3$  de 0.32 pmolas/mg proteína. En las fracciones subcelulares, la unión específica de ácido glutámico  $H^3$  es ligeramente mayor en la fracción  $P_1$ -0.246 pmolas/mg proteína- que contiene las terminales de los fotorreceptores, que en la fracción  $P_2$ -0.19 pmolas/mg proteína- que contiene las terminaciones de la capa plexiforme interna. Tanto en la retina completa como en las fracciones, observó una cinética con un solo componente saturable entre 15 y 22 pmolas/mg proteína y con una  $K_B$  de 0.55  $\mu M$ .

En el caso de otros aminoácidos como el GABA o la glicina, los receptores postsinápticos se han podido identificar gracias a la existencia de compuestos como la bicuculina y la picrotoxina que se sabe que únicamente afectan la acción sináptica de dichos aminoácidos. De esta manera, al utilizarlos como ligandos, se elimina la posibilidad de interacción con receptores como los de captación. Desafortunadamente, no se conoce ningún agonista o antagonista de acción general para los receptores postsinápticos de los ácidos glutámico o aspártico por lo que es necesario utilizar estos mismos compuestos como desplazadores. Los compuestos que se han probado hasta el momento son inespecíficos en mayor o menor grado y, por lo tanto, no permiten distinguir los receptores sinápticos de ácido glutámico de los de ácido aspártico ni tampoco diferenciar los receptores postsinápticos de otros tipos de receptores como serían los receptores presinápticos de captación de alta afinidad o los receptores extrasinápticos. Los compuestos que han resultado más eficaces para bloquear el efecto neuroexcitador de estos dos aminoácidos in vivo son el dietil ester del glutamato (GDEE) para el ácido glu

támico y el D- $\alpha$ -amino adipato (D- $\alpha$ -AA) para el ácido aspártico, aunque existe el problema de que su acción es específica únicamente para ciertas áreas del Sistema Nervioso Central.

Se ha demostrado que los ácidos glutámico y aspártico ejercen su acción excitadora por interacción con diferentes tipos de receptores en la membrana (Coombs y col., 1955). Para apoyar esta idea se han hecho numerosos estudios tanto in vivo como in vitro.

Por estudios in vivo tomando en cuenta la sensibilidad de los receptores al GDEE y al  $\alpha$ -AA en presencia de cationes divalentes como el  $Mg^{++}$ , Watkins (1978) los clasificó en tres grupos:

1. Los que son activados por el N-metil-DL-aspartato (NMDA), ibotenato, D-glutamato y L-homocisteato. La acción excitadora de estos compuestos es antagonizada por el D- $\alpha$ -AA y se inhibe en presencia de concentraciones relativamente bajas de  $Mg^{++}$ .
2. Los receptores activados por quisqualato, cuya respuesta es bloqueada por el GDEE y no por el D- $\alpha$ -AA lo cual los diferencia de los anteriores. Con este tipo interactúa el ácido L-glutámico.
3. Los receptores activados por ácido kaínico, que no son sensibles al aumento en la concentración de  $Mg^{++}$  en el medio ni a la acción del GDEE o del  $\alpha$ -AA.

Los estudios in vitro proceden de resultados empleando la técnica de la interacción de un ligando radioactivo con el receptor solubilizado o en membranas. Esta técnica, desarrollada por Enna y Snyder en 1976 para caracterizar los receptores postsinápticos a GABA en retina de bovino, consiste en obtener las membranas, congelarlas durante algún tiempo, descongelarlas e incubarlas con un ligando radioactivo, en un medio sin

$\text{Na}^+$ , en ausencia o presencia del mismo compuesto no radioactivo o de un agonista o antagonista específico para desplazar, por competencia, al ligando radioactivo del receptor y de este modo calcular el valor de la unión específica ligando-receptor. Estos ensayos se hacen en ausencia de  $\text{Na}^+$  y en membranas previamente congeladas para diferenciar las interacciones del ligando con receptores de captación de las interacciones con receptores sinápticos. Los receptores de captación requieren de  $\text{Na}^+$  y de energía para que la interacción ligando-receptor se lleve a cabo, por lo tanto, en ausencia de  $\text{Na}^+$  y en membranas que han sido congeladas se puede descartar este tipo de interacción. Los receptores sinápticos, por su parte, interactúan con el transmisor independientemente de la presencia de  $\text{Na}^+$ ; en cuanto a la congelación de las membranas, Sharif y Roberts (1980) demostraron que la unión específica en membranas congeladas de cerebelo y corteza desaparece casi totalmente, sin embargo, en la retina, López Colomé (1981) comprobó que en ausencia de  $\text{Na}^+$  la unión específica de ácido glutámico  $\text{H}^3$  tiene incluso valores más altos en las membranas congeladas que en las frescas. Esta discrepancia se debe probablemente a diferencias en la preparación de las membranas o en las condiciones del ensayo. Con esta técnica es posible determinar las características cinéticas y farmacológicas de la interacción.

Desde el punto de vista cinético, la interacción ligando-receptor debe ser saturable y presentar un componente de alta afinidad con una  $K_m$  aparente ( $K_B$ ) en el orden de  $\text{nM}$ . El obtener una  $K_B$  en este orden también descarta la interacción con receptores de captación o con enzimas que utilicen al glutámico o al aspártico como sustratos, ya que la  $K_m$  para estos procesos está en el orden de  $\text{mM}$ . Como se observa en los

datos cinéticos para el ácido glutámico señalados anteriormente, este compuesto cumple con este criterio.

Desde el punto de vista farmacológico, los compuestos que modifican el efecto de los transmisores en una preparación fisiológica deben afectar la interacción con el receptor de manera paralela. Por lo tanto, tomando en cuenta los resultados farmacológicos de competencia a nivel del receptor y su estereoespecificidad, Johnston (1979) clasifica a los receptores de ácido glutámico y ácido aspártico en cuatro clases:

1. Los que unen preferentemente al ácido glutámico en configuración extendida y pueden estudiarse utilizando al ácido kaínico como ligando.
2. Los que unen preferentemente ácido glutámico en configuración parcialmente plegada y pueden estudiarse usando ácido L-glutámico como ligando.
3. Los que interactúan principalmente con el ácido aspártico y se estudian empleando a este mismo compuesto como ligando.
4. Los que aceptan indistintamente a los ácidos L-aspártico o L-glutámico, pero no al ácido kaínico y pueden estudiarse empleando al ácido D-aspártico como ligando ya que éste interactúa con el receptor de transporte que es común a ambos aminoácidos.

Desde 1955 se sabe, por los estudios de Coombs y col., que, a pesar de que el ácido glutámico se encuentra en concentraciones intracelulares relativamente altas, la aplicación de ácido glutámico extracelular provoca una excitación en prácticamente todas las neuronas del Sistema Nervioso Central. Más tarde, por estudios neuroquímicos se vio que la acción despolarizante del ácido glutámico extracelular va acompañada

de una entrada importante de  $\text{Na}^+$  y agua a la célula y una disminución de los niveles intracelulares de  $\text{K}^+$  y ésteres fosfóricos de alta energía (Harvey y McIlwain, 1968; Okamoto y Quastel, 1970). Curtis, en 1969, propuso que este efecto implica una interacción directa del ácido glutámico con receptores de membrana, ya sea sinápticos o extrasinápticos, que provoca la despolarización de la membrana y la entrada de iones  $\text{Na}^+$  a través de ésta; este efecto es producido por todos los aminoácidos de fórmula  $\text{X}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ , donde  $\text{X}=\text{COOH}$  ó  $\text{SO}_2\text{H}$  y  $n=1$  ó  $2$ . Olney y col., en 1971, dieron el nombre de aminoácidos excitotóxicos a aquellos que excitan reversiblemente a las neuronas o las destruyen selectivamente por un efecto despolarizante al interactuar con receptores en las dendritas o somas neuronales. Los aminoácidos excitotóxicos producen un "síndrome tipo glutámico" ocasionando un estado de emergencia que lleva inicialmente a la excitación neuronal por despolarización y, finalmente, si la concentración extracelular no es corregida rápidamente, a la necrosis celular.

El ácido kaínico es un análogo heterocíclico del ácido glutámico (Figura 2) que se extrajo originalmente del alga Digenea simplex. En 1970, Shinozaki y Konishi encontraron que el ácido kaínico excitaba a las neuronas corticales y potenciaba el efecto producido por el ácido L-glutámico aplicado iontoforéticamente. Estos hechos hicieron que Johnston y col., en 1974, presentaran la hipótesis de que el ácido kaínico pudiera actuar como un agonista en los receptores del ácido glutámico. Sin embargo, Coyle y col. (1978) caracterizaron los receptores para ácido kaínico  $\text{H}^3$  en la retina de pollo y encontraron que difieren de los receptores de ácido glutámico por su cinética, que presenta dos

componentes, uno de baja afinidad con una  $K_B$  de 45 nM y otro de alta afinidad con una  $K_B$  de 2.2 nM. En cuanto a la farmacología, también existen diferencias entre los dos tipos de receptores ya que el ácido glutámico desplaza el 100% de la unión específica de ácido kaínico  $H^3$  al receptor, mientras que el ácido kaínico no desplaza al glutámico  $H^3$  unido específicamente a su receptor (López-Colomé, 1981). Recientemente, Morgan (1983), por estudios fisiológicos de los receptores a ácido kaínico, sugiere que el neurotransmisor liberado por los fotorreceptores debe ser una molécula similar al ácido kaínico que presente una alta afinidad por dos diferentes tipos de receptores, uno relacionado con respuestas despolarizantes en las bipolares OFF y el otro con respuestas hiperpolarizantes en las bipolares ON. Sin embargo, no se ha encontrado aún dicha molécula. Zaczec y col. (1983) identificaron un dipéptido, el N-acetilaspartilglutamato (NAAG), que tiene una alta afinidad  $-K_B=420$  nM- por los receptores de ácido glutámico en el cerebro y presenta un efecto neurotóxico intermedio entre el ácido glutámico y el kaínico, lo cual podría sugerir que el neurotransmisor liberado por el fotorreceptor fuera un péptido, ya sea éste o uno similar.

En 1977, Schwarcz y Coyle demostraron que el ácido kaínico inyectado intraocularmente degenera la capa plexiforme interna de la retina. Más tarde, McGeer, Olney y McGeer (1978) utilizaron este compuesto para degenerar selectivamente poblaciones de neuronas en el Sistema Nervioso Central, por ejemplo, en el hipotálamo y en la sustancia nigra. Sin embargo, el mecanismo por el cual el ácido kaínico ejerce su acción neurotóxica aún no está claro. Biziere y Coyle (1978a) demostraron que la incubación de rebanadas de cerebro con concentraciones milimolares de

ácido kaínico provoca un aumento significativo en las concentraciones intracelulares de  $\text{Na}^+$  y de agua; esto podría indicar un efecto excitotóxico como el descrito por Olney y col. (1971) para el ácido glutámico.

Otra hipótesis es que la activación de los receptores a ácido kaínico en combinación con la despolarización inducida por el ácido glutámico produce un aumento en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$ . En la placa neuromuscular existen alteraciones histopatológicas producidas por concentraciones intracelulares elevadas de  $\text{Ca}^{++}$ . El hinchamiento de las dendritas producido por el ácido kaínico, así como la dilatación del retículo endoplásmico y la desorganización de la citoarquitectura principalmente en el área de los receptores neuronales, es muy similar a las alteraciones patológicas en la placa neuromuscular, lo cual podría apoyar esta hipótesis (Coyle y col., 1978).

En 1981, Morgan e Ingham describieron un método para degenerar selectivamente los distintos tipos celulares a diferentes dosis de ácido kaínico. Según estos autores, la sensibilidad va en el siguiente orden: amacrinas -60 nmolas de ácido kaínico- > horizontales y bipolares -120 nmolas- > ganglionares y fotorreceptores; éstas últimas son resistentes a dosis hasta de 200 nmolas de ácido kaínico. La técnica consiste en inyectar por vía intravitreal a pollos de un día de edad con 10  $\mu\text{l}$  de ácido kaínico disuelto en solución salina. La disección de las retinas se hace 15 días después de la inyección.

Recientemente, Dvorak y Morgan (1983) mostraron que una población de bipolares, las bipolares OFF, que se despolarizan con el neurotransmisor liberado por el fotorreceptor en la oscuridad, mueren antes que las células amacrinas, es decir, a dosis inferiores a 60 nmolas de ácido kaí

nico, lo cual hace aún más específico el efecto degenerativo del ácido kaínico en la retina.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los receptores de ácido aspártico en la retina de pollo para compararlos con los de ácido glutámico caracterizados en 1981 por López-Colomé y ver si se trata de un mismo receptor o de poblaciones diferentes, y posteriormente, utilizando la técnica de degeneración diferencial de las distintas poblaciones celulares con ácido kaínico, localizar los receptores con características de postsinápticos para los ácidos glutámico y aspártico en retinas tratadas con diferentes dosis de ácido kaínico con el fin de observar si existe una distribución heterogénea de estos receptores según el tipo celular.

#### METODOS:

Como se indicó anteriormente, la técnica para medir receptores con características de postsinápticos se describió en 1976 por Enna y Snyder. El procedimiento consiste en homogeneizar las retinas en 20 volúmenes (p/v) de agua bidestilada en un homogeneizador de vidrio para romper las células por choque osmótico. El homogenado se deja en hielo durante 15 minutos con el fin de completar el rompimiento y se centrifuga a 45,000 x g durante 20' a 4°C para sedimentar las membranas. Después de lavarlas dos veces, resuspendiéndolas en el mismo volumen de agua y centrifugando nuevamente a la misma velocidad, se congelan las membranas por un periodo que puede ir de 48 hrs a 2 semanas.

Pasado este tiempo, se descongelan y se resuspenden en 100 volúmenes, de acuerdo con el peso original, de buffer Tris-Citrato pH 7.1 a 4°C. A este homogenado se le agrega Tritón X-100 a una concentración final de

0.05% (v/v) y la suspensión se incubaba a 37°C durante 30'. El Tritón X-100 es un detergente, y Enna y Snyder (1976) reportaron un aumento de la unión específica en algunas preparaciones probablemente debido a que desenmascara algunas proteínas integrales de la membrana o elimina, según Yoneda y Kuriyama (1980), algunos elementos inhibidores. Después de la incubación, se centrifugan nuevamente a 45,000 X g durante 20' a 4°C para eliminar el detergente. Las membranas sedimentadas se resuspenden nuevamente en el mismo buffer y se procede a realizar el ensayo:

Se toman alícuotas de aproximadamente 500 µg en 0.95 ml del homogenado de membranas y se incuban en hielo durante 10' con el compuesto radioactivo en una concentración por debajo de la  $K_D$ , para medir la unión inespecífica y, por otra parte, con el compuesto radioactivo mas un agonista o antagonista específico de la acción postsináptica del compuesto a una concentración de 1 mM, para calcular la unión específica al receptor. La reacción se para por centrifugación a 45,000 x g durante 20' a 4°C. Las membranas se lavan dos veces superficialmente con agua helada y se resuspenden en 0.2 ml de agua. Se les añade líquido de centelleo y se cuenta la radioactividad.

Esta técnica fue la que se utilizó para medir los receptores de ácido aspártico en las retinas normales y de ácido glutámico y ácido aspártico en las retinas degeneradas con ácido kaínico, con la diferencia de que nosotros utilizamos buffer Tris-HCl 0.1 M pH 7.4 en lugar de buffer Tris-Citratos.

Para el ensayo se utilizó una concentración de 20 nM del ligando radioactivo -ácido L-aspártico  $H^3$  y ácido L-glutámico  $H^3$ - en ausencia o presencia de 1 mM de ácido L-aspártico o ácido L-glutámico respectivamente

como desplazadores ya que, como se indicó anteriormente, no se conocen agonistas o antagonistas específicos de la acción postsináptica de estos compuestos. El volumen final fue de 1 ml.

Como líquido de centelleo se emplearon 10 ml/muestra de Tritosol, cuya fórmula es la siguiente (Fricke, 1975):

Para un volumen final de 1 litro:	Xileno . . . . .	600 ml
	Tritón X-100 . . . . .	257 ml
	Etilenglicol . . . . .	37 ml
	Etanol absoluto . . . . .	106 ml
	PPO . . . . .	3 g

La cantidad de proteína en cada muestra se determinó por el método descrito por Lowry y col. en 1951:

- a) Se tomó una alícuota de 0.1 ml del homogenado final de membranas y se ajustó a 0.4 ml con agua.
- b) Para la curva standard se tomaron alícuotas de 50, 100 y 150  $\mu$ l de una solución de albúmina de 50  $\mu$ g/0.1 ml y se ajustaron también a 0.4 ml con agua.
- c) Como blanco se utilizó un tubo con 0.4 ml de agua bidestilada.
- d) A cada tubo se le añadieron 2 ml de la siguiente solución:  
98% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0.1 M + 1% de  $\text{CuSO}_4$  al 1% + 1% de Tartrato de Potasio al 2%. Se agitaron y se dejaron a temperatura ambiente durante 10'.
- e) A cada tubo se le añadieron 0.2 ml de Folín-Ciocalteu, reactivo de Fenol, diluido 1:1 (v/v) con agua. Se agitaron y se dejaron 30' a temperatura ambiente.
- f) Se leyó la densidad óptica a 500 nm en un espectrofotómetro Zeiss.

Para la localización de los receptores en las retinas degeneradas,

se inyectaron por vía intravitreal pollitos machos de un día de edad con 10  $\mu$ l de ácido kaínico en concentraciones de 60, 120 y 200 nmolas, disuelto en solución salina al 9% a pH 7.4, en el ojo derecho, utilizando una jeringa Hamilton. Como un primer control, se inyectaron varios pollitos solamente con 10  $\mu$ l de solución salina y se vió que no había diferencia entre el ojo inyectado y el control, por lo cual, en los pollos tratados con ácido kaínico se utilizó el ojo izquierdo, no inyectado, como control.

Los pollos se dejaron crecer durante dos semanas en condiciones normales de luz y alimentación y después se sacrificaron para extraer las retinas y realizar los ensayos de medición de receptores.

El control de la degeneración de las retinas se hizo por microscopía óptica:

Se disecaron las retinas y se fijaron en glutaraldehído al 3% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.2 durante 2 hrs a 4°C. Después se hicieron dos cambios en el mismo buffer, en el cual se quedaron las retinas durante la noche. La postfijación se hizo en tetróxido de osmio al 2% durante 2 hrs. Después, se deshidrataron y se dejaron toda la noche en una mezcla de epón-óxido de propileno 1:1. Finalmente, se incluyeron en epón y se obtuvieron cortes de 1  $\mu$ m de espesor que fueron montados y teñidos con azul de toluidina.

Para el tratamiento estadístico se aplicaron pruebas de análisis de varianza.

Los aminoácidos radioactivos: ácido L-glutámico  $H^3$  con una actividad específica de 43 a 46 Ci/mmol y ácido L-aspártico, con una actividad específica de 10 a 17.3 Ci/mmol, se obtuvieron de la New England Nuclear Corp., Boston, Massachusetts. Todos los demás reactivos son de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA.

## RESULTADOS:

Al estudiar la unión de ácido aspártico entre 1 y 30 nM en membranas congeladas de las fracciones  $P_1$  y  $P_2$  de retinas de pollo, se vio que es independiente de  $Na^+$  en las membranas congeladas y que presenta una cinética saturable con dos componentes en cada fracción: en la  $P_1$ , uno de mayor afinidad con una  $K_B$  de 40 nM y una  $B_{max}$  de 0.666 pmolas/mg proteína y una de menor afinidad con una  $K_B$  de 291 nM y una  $B_{max}$  de 4.8 pmolas/mg proteína y en la  $P_2$ , la de mayor afinidad con una  $K_B$  de 11.8 nM y una  $B_{max}$  de 0.4 pmolas/mg proteína y la de menor afinidad no saturable a una concentración de 1  $\mu$ M (Figura 3).

Por otra parte, la unión específica de ácido aspártico  $H^3$  se concentra 7 veces en la fracción  $P_1$  -0.94 pmolas/mg proteína- y 4 veces en la  $P_2$  -0.6 pmolas/mg proteína.

En cuanto a la farmacología, los desplazadores más potentes de la unión de ácido aspártico  $H^3$  con el receptor fueron el ácido L-aspártico y el ácido L-glutámico. El  $\alpha$ -amino adipato desplazó un 71% de la unión en ambas fracciones; el N-metil-DL-aspartato desplazó el 79% en  $P_1$  y el 63% en  $P_2$  y el dietil ester del glutamato desplazó únicamente de un 48 a un 50% en ambas fracciones. El receptor mostró una estereoespecificidad similar en  $P_1$  y  $P_2$  ya que los D-isómeros de estos aminoácidos desplazaron entre un 40 y un 48% de la unión en ambas fracciones (Tabla I).

Los resultados de la microscopía óptica de las retinas degeneradas concuerdan con los reportados por Morgan e Ingham en 1981. En las retinas tratadas con 60 nmolas de ácido kaínico desaparecieron la mayor parte de las células amacrinas y se redujo en aproximadamente un 40% el espesor de la capa plexiforme interna comparado con el de la retina con

trol. En las retinas lesionadas con 120 nmolas de ácido kaínico, además de las amacrinas, desaparecieron la mayor parte de las células horizontales y las restantes aparecieron hinchadas. Después del tratamiento con 200 nmolas de ácido kaínico sólo se conservaron las células ganglionares y los fotorreceptores, aunque en algunos casos aún se observaron algunas bipolares (Figura 4).

Como puede observarse en la tabla II, en las retinas lesionadas con 60 nmolas de ácido kaínico se produjo una disminución del 23% de la unión específica de ácido glutámico- $H^3$ , de  $1.5 \pm 0.17$  a  $1.2 \pm 0.2$  pmolas/mg proteína, y del 20% de la unión específica de ácido aspártico- $H^3$ , de  $1.1 \pm 0.09$  a  $0.88 \pm 0.05$  pmolas/mg proteína, en comparación con sus respectivos controles.

Con 120 nmolas de ácido kaínico, la unión específica de ácido glutámico- $H^3$  disminuyó en un 78% con respecto al control, de  $1.73 \pm 0.26$  a  $0.50 \pm 0.05$  pmolas/mg proteína, es decir, un 48% más en relación a las retinas lesionadas con 60 nmolas; la unión específica de ácido aspártico- $H^3$  disminuyó en un 43% con respecto al control -de  $1.09 \pm 0.1$  a  $0.63 \pm 0.08$  pmolas/mg proteína- y un 23% con respecto a las retinas tratadas con 60 nmolas.

Con el tratamiento de 200 nmolas de ácido kaínico, la unión específica de ácido glutámico- $H^3$  se mantuvo en valores similares a los de las retinas lesionadas con 120 nmolas, disminuyendo únicamente un 1% más, de  $1.62 \pm 0.3$  a  $0.45 \pm 0.058$  pmolas/mg proteína con respecto al control. En cambio, la unión de ácido aspártico- $H^3$  disminuyó aún un 22% más, de  $1.27 \pm 0.17$  a  $0.45 \pm 0.06$  pmolas/mg proteína (Figuras 5 y 6).

TABLA I

DESPLAZAMIENTO DE GLUTAMATO H<sup>3</sup> Y ASPARTATO H<sup>3</sup> POR ANALOGOS ESTRUCTURALES

Análogo	% de desplaz. de <sup>3</sup> H-Glu*		% de desplaz. de <sup>3</sup> H-Asp	
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>
L-glutamato	100	100	100	100
L-aspartato	89	98.9	100	100
D-glutamato	45.5	95	48	40
D-aspartato	47.5	70.5	47	45
GDEE	77	85.2	48	50
NMDA	62.2	73.9	79	63
DL-α-amino adipato	60	73.4	71	71
Kainato	0	0	48	33

Los resultados muestran el porcentaje con respecto al máximo desplazamiento del ligando radioactivo por L-glutamato y L-aspartato respectivamente. Las concentraciones utilizadas fueron 20 nM para los ligandos radioactivos y 1 μM ó 1 mM, dependiendo de las IC<sub>50</sub>, para los desplazadores. Cada dato es el promedio de 6-10 experimentos por duplicado, con variaciones de menos del 15%.

\*Tomado de López-Colomé, 1981

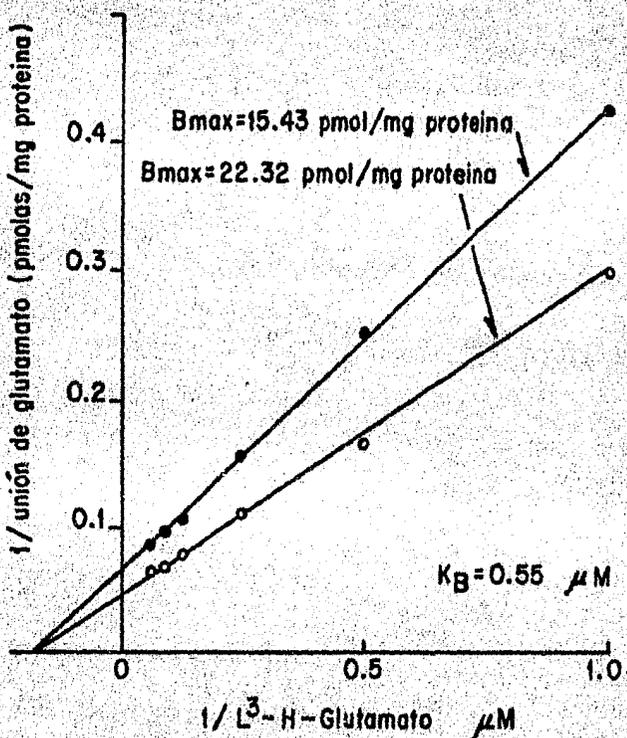
TABLA II

DESPLAZAMIENTO DE GLUTAMATO H<sup>3</sup> Y ASPARTATO H<sup>3</sup> EN RETINAS TRATADAS CON KAINATO

	GLUTAMATO H <sup>3</sup>	ASPARTATO H <sup>3</sup>
control	100%	100%
60 nmolas de kainato	77%	80%
120 nmolas de kainato	29%	57%
200 nmolas de kainato	28%	35%

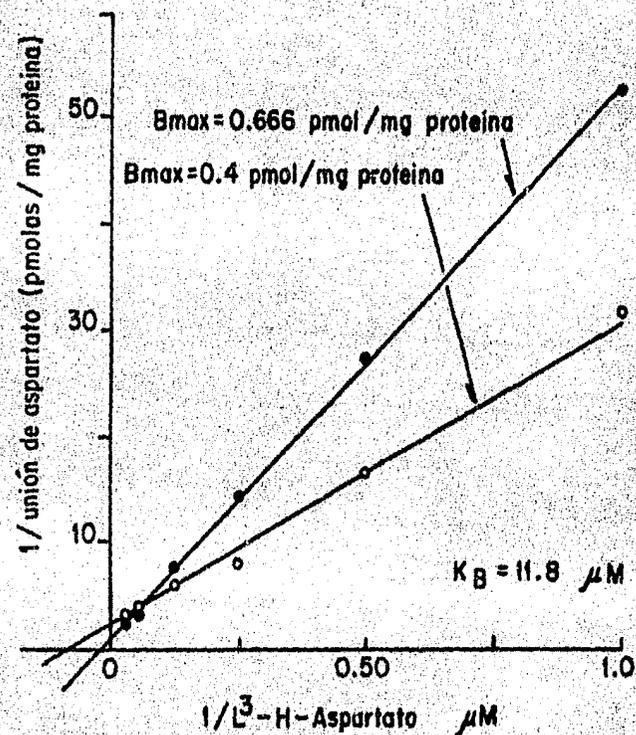
Los resultados muestran el porcentaje de desplazamiento de glutamato H<sup>3</sup> ó aspartato H<sup>3</sup> (20 nM) por L-glutamato y L-aspartato (1 mM) respectivamente. Cada dato es un promedio de 4-6 experimentos por triplicado.

CINETICA DE LA UNION DE L-GLUTAMATO



a)

CINETICA DE LA UNION DE L-ASPARTATO



b)

Figura 3

Las gráficas muestran las curvas de Lineweaver-Buck para la unión específica independiente de  $\text{Na}^+$  de glutamato  $\text{H}^3$  y aspartato  $\text{H}^3$ . Cada punto representa el promedio de 4-6 experimentos por triplicado.

• = fracción  $P_1$

○ = fracción  $P_2$

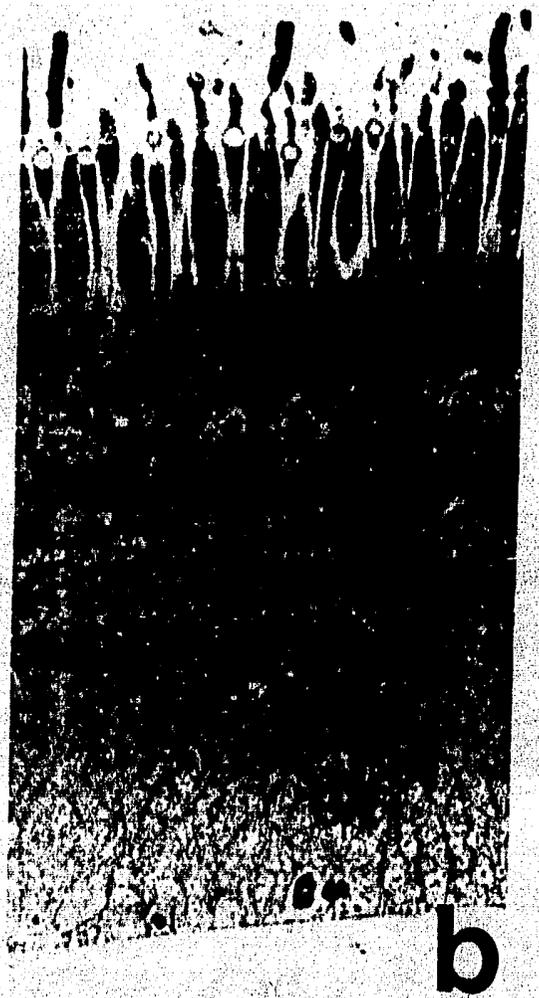
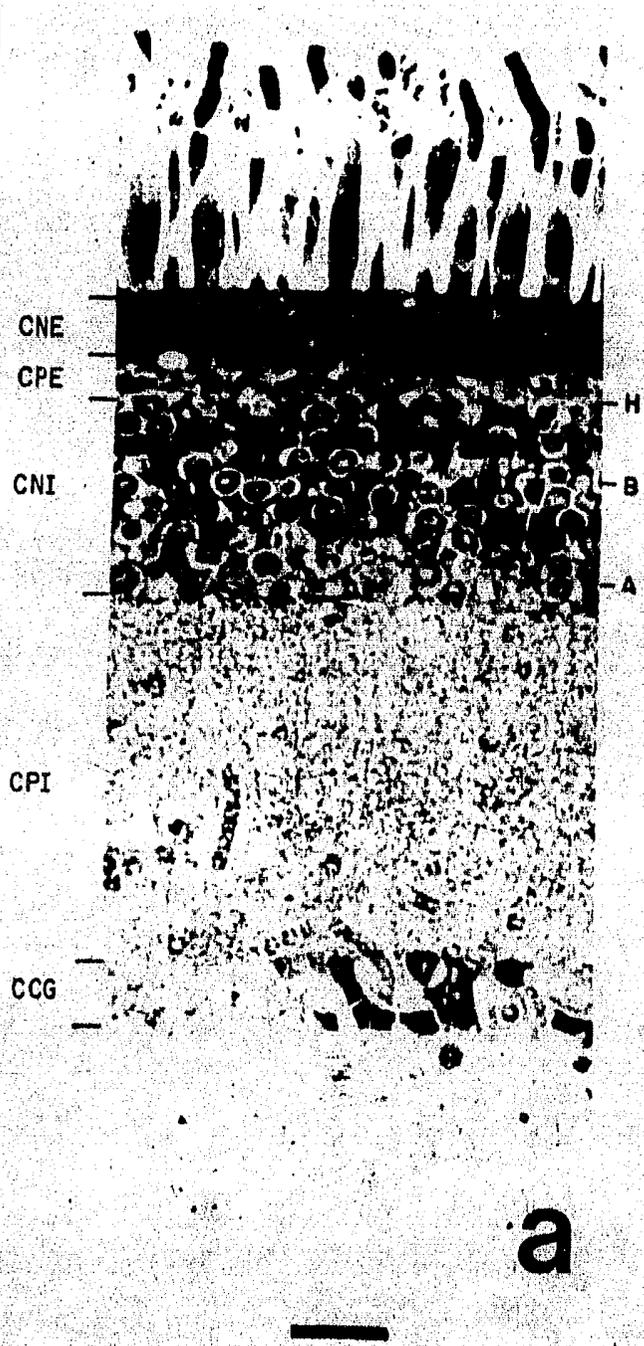
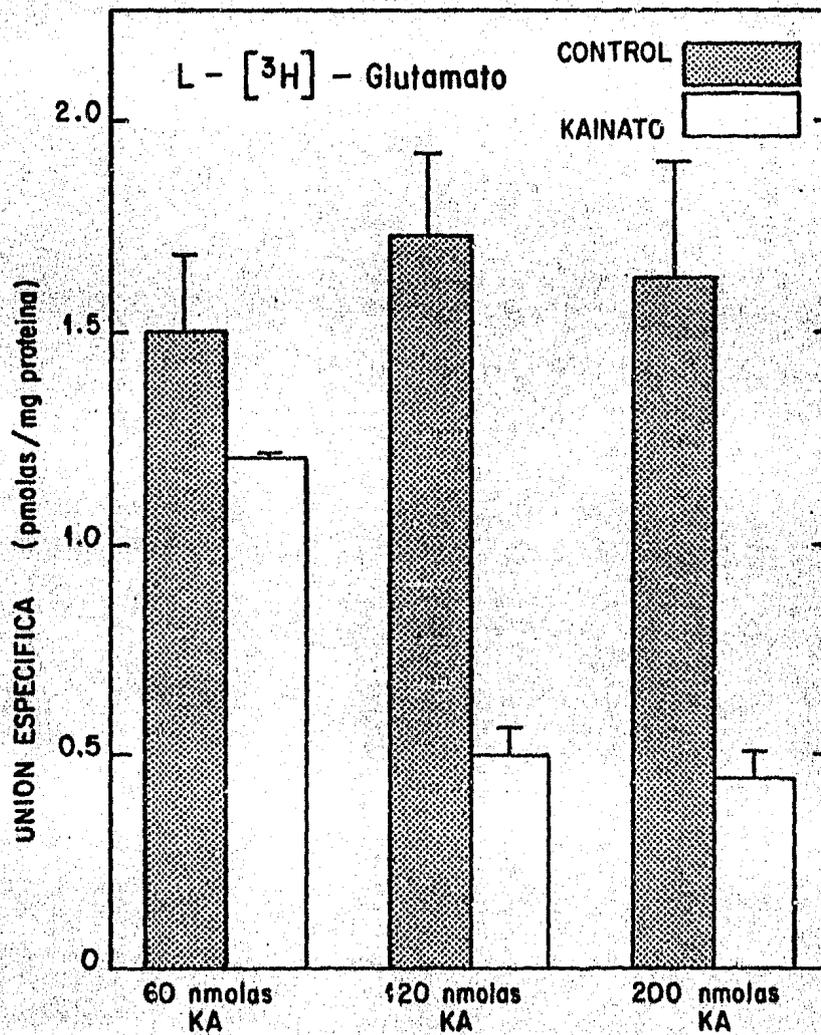


Figura 4

**FIGURA 4:**

Cortes transversales de retinas de pollo control y tratadas con ácido kaínico. CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares; H: células horizontales; B: células bipolares; A: células amacrinas. a) retina normal; b) retina tratada con 60 nmolas de ácido kaínico; c) retina tratada con 120 nmolas de ácido kaínico; d) retina tratada con 200 nmolas de ácido kaínico. La barra de calibración representa 40  $\mu$ m.



*Figura 5*

Efecto de la inyección intraocular de ácido kaínico sobre la unión específica de L-glutamato H<sup>3</sup>. Los datos son el promedio +E.S. de 4-6 experimentos por triplicado. En cada experimento, las membranas provienen del ojo tratado y del control del mismo pollo.

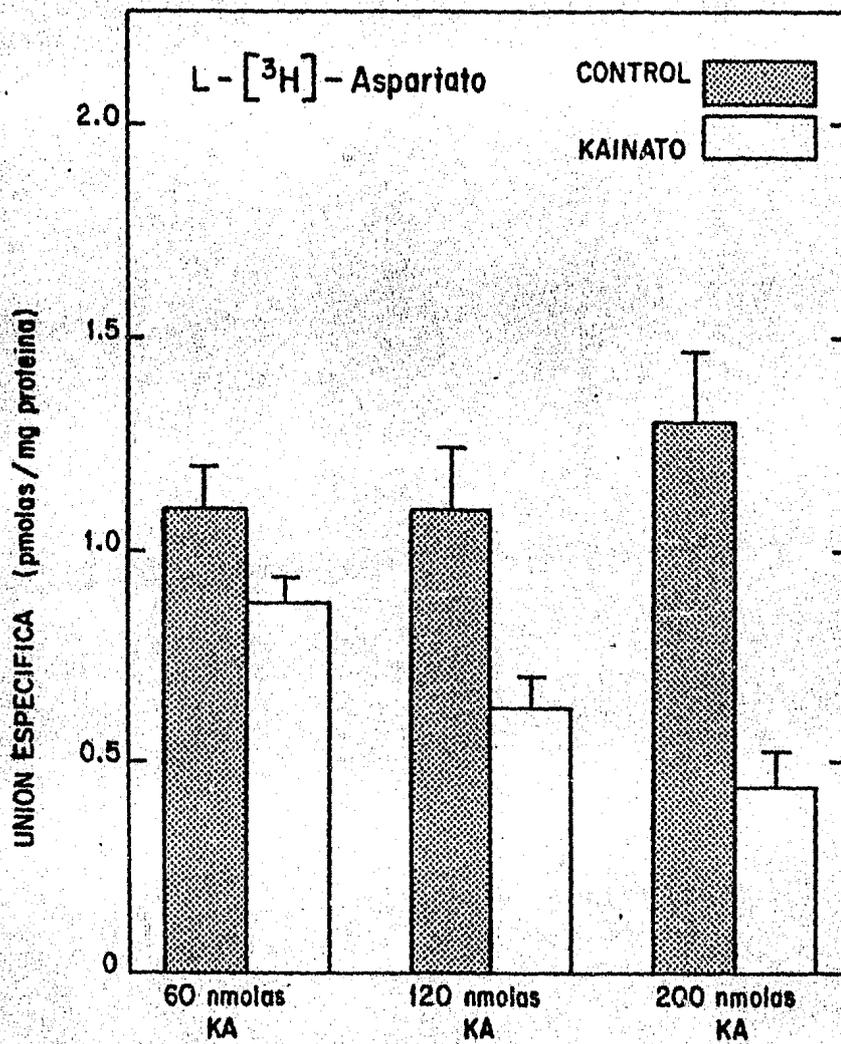


Figura 6

Efecto de la inyección intraocular de ácido kaínico sobre la unión específica de L-aspartato H<sup>3</sup>. Los datos son el promedio + E.S. de 4 - 6 experimentos por triplicado. En cada experimento, las membranas provienen del ojo tratado y del control del mismo pollo.

## DISCUSION

Por lo que se refiere a la medición de los receptores, trabajamos en condiciones en que únicamente se observan los receptores sinápticos. Como se mencionó anteriormente, al trabajar con membranas congeladas y en un medio sin sodio, se elimina la posibilidad de medir receptores de captación, ya que se requiere de energía y de  $\text{Na}^+$  para que pueda darse la interacción de estos receptores con el transmisor. Por otra parte, Sharif y Roberts (1980) demostraron la existencia de inhibidores endógenos de la unión específica de ácido glutámico que se eliminan lavando varias veces las membranas, preincubándolas a altas temperaturas, o al tratarlas con detergentes. Por lo tanto, en nuestras condiciones, tanto el lavado exhaustivo de las membranas, como la incubación de las mismas con Tritón X-100 elimina esta posibilidad. Esto concuerda con los resultados de López-Colomé (1981) en los que se observa que la unión específica de ácido glutámico a membranas congeladas de retina de pollo aumenta con el tratamiento con Tritón X-100.

Entre los receptores presentes en una preparación de membranas sinápticas, podemos distinguir cuando menos dos tipos: los postsinápticos y los extrasinápticos o autorreceptores, que se encuentran en la terminal presináptica y mediante los cuales el transmisor podría modular su propia liberación. Fisiológicamente, es posible diferenciarlos ya que el registro se hace en células distintas; sin embargo, tiene la desventaja de que la respuesta que se mide es el resultado de la integración sináptica de varios estímulos que recibe simultáneamente esa neurona. Bioquímicamente, estos receptores tienen las mismas características, por lo cual no es posible distinguirlos en nuestra preparación in vitro.

Por este motivo, el número de receptores determinado en este tipo de estudios representa una suma de los dos tipos de receptores.

Al comparar las características de los receptores de ácido aspártico con los de ácido glutámico (López-Colomé, 1981), se observa que son diferentes:

- La unión específica de ácido aspártico  $H^3$  se concentra 7 veces en la fracción  $P_1$  y 4 veces en la  $P_2$ , mientras que la de ácido glutámico no se concentra importantemente en ninguna de las fracciones.
- La unión de ácido aspártico  $H^3$  presenta dos componentes cinéticos en cada fracción, mientras que la de ácido glutámico  $H^3$  presenta un sólo componente tanto en la retina completa como en las fracciones.
- Como puede observarse en la tabla I, también existen diferencias en cuanto a la farmacología: el  $\alpha$ -AA y el NMDA, que son los desplazadores más potentes de la unión de ácido aspártico  $H^3$  con su receptor, desplazan únicamente del 60 al 70% del ácido glutámico  $H^3$  unido a su receptor, y viceversa, el GDEE, que desplaza entre el 70 y el 80% del ácido glutámico  $H^3$  unido específicamente, desplaza sólo entre 40 y 50% del ácido aspártico  $H^3$ . Por otra parte, el receptor de ácido aspártico  $H^3$  muestra una estereoespecificidad similar en ambas fracciones, mientras que el de ácido glutámico  $H^3$  muestra una mayor estereoespecificidad en la fracción  $P_1$  que en la  $P_2$ .

Por lo tanto, se puede concluir que existen al menos dos poblaciones diferentes de receptores para estos aminoácidos: una para ácido glutámico y otra para ácido aspártico.

El segundo objetivo de este trabajo fue utilizar la técnica descrita por Morgan e Ingham (1981) de degeneración diferencial de las dis

tintas poblaciones celulares de la retina como una herramienta para medir los receptores a ácido glutámico y ácido aspártico en los diferentes tipos neuronales de la retina y dilucidar así que vías neuronales podrían utilizar a uno u otro de estos aminoácidos como neurotransmisores. Para ésto, hay que tomar en consideración varios aspectos:

-La disminución del número de receptores a una molécula al degenerar a un cierto tipo de neuronas implica que esa sinapsis química podría utilizar dicha molécula como neurotransmisor; es decir, que ésta se libera de la célula presináptica. Así, si al degenerar por ejemplo las células horizontales y bipolares disminuye el número de receptores a ácido glutámico, esto implica que el fotorreceptor podría estar liberando este aminoácido como neurotransmisor.

-Los primeros estudios de degeneración de células de la retina con ácido kaínico son los de Biziere y Coyle (1978b) que utilizaron una sola dosis alta de ácido kaínico para degenerar la capa interna de la retina. Morgan e Ingham (1981) utilizaron este método, pero su aportación consiste en que lograron degenerar selectivamente los distintos tipos neuronales según la dosis de ácido kaínico empleada. Estos autores comprobaron la especificidad de su método tanto fisiológicamente, por registro de la actividad eléctrica en las diferentes poblaciones celulares y correlacionando la desaparición de la respuesta con la desaparición de un determinado tipo celular, como morfológicamente, por medio de microscopía electrónica. Nuestro estudio representa un apoyo desde el punto de vista bioquímico a la especificidad de este método; sin embargo, se hizo también el análisis morfológico de la degeneración con el fin de corroborar los resultados de Morgan y estar seguros de trabajar con el

mismo sistema. Para ésto, se cuidó de que los cortes de retina para la microscopía fueran siempre de la misma región, ya que la retina no tiene un grosor homogéneo y, por lo tanto, cortes en diferentes áreas podrían dar lugar a interpretaciones inexactas en cuanto al efecto degenerativo del ácido kaínico.

Al correlacionar nuestros resultados con las lesiones histológicas producidas por la inyección de las diferentes dosis de ácido kaínico, existen las siguientes posibilidades:

1. Las células amacrinas parecen tener la misma cantidad de receptores para ácido glutámico y ácido aspártico. Esto sería extensivo para las bipolares OFF en el caso de que, como postulan Dvorak y Morgan (1983) ya hubieran desaparecido a esta dosis de 60 nmolas de ácido kaínico.
2. Entre todos los tipos celulares de la retina, las células horizontales parecen tener la mayor cantidad de los receptores a ácido glutámico y una pequeña fracción de los receptores a ácido aspártico.
3. Las bipolares que no han desaparecido a una dosis de 120 nmolas de ácido kaínico, las bipolares ON según Dvorak y Morgan (1983), parecen tener únicamente receptores a ácido aspártico.
4. Los receptores que aún se observan a una dosis de 200 nmolas de ácido kaínico, es decir, el 28% de los receptores a ácido glutámico y el 35% de los receptores a ácido aspártico, podrían corresponder a receptores postsinápticos en las células ganglionares.

Puesto que en este estudio se usaron los mismos compuestos como ligandos, podría existir una interacción y que estuviéramos midiendo una mezcla de receptores para ácido glutámico y ácido aspártico. Para descartar que fuese un solo tipo de receptor, aplicamos pruebas es

tadísticas de análisis de varianza que permiten discernir si existe una diferencia tanto entre los valores obtenidos con cada dosis, como entre los dos tipos de receptores medidos. Los valores obtenidos indican que el efecto de las diferentes dosis es específico ( $F=35$ ,  $P < 0.0001$ ) y que no existe correlación entre las dos poblaciones de receptores ( $F=2.09$ ,  $P < 0.165$ ) que, por lo tanto, son diferentes.

Desde el punto de vista bioquímico y farmacológico, pensamos determinar a qué tipo de receptores a aminoácidos excitadores corresponden para saber más precisamente a qué células pertenecen.

Pensamos que la aportación de este trabajo se puede aplicar a dos áreas: en el campo del estudio de la retina hemos contribuido con un modelo que, tanto desde el punto de vista morfológico como fisiológico y bioquímico-farmacológico, puede ayudar al esclarecimiento de los circutos neuronales de la retina en general, y en particular de los que emplean como neurotransmisores a los aminoácidos excitadores, puesto que previamente hemos establecido las condiciones óptimas para medirlos y distinguir uno de otro. Por otra parte, en el campo del estudio de los receptores a aminoácidos excitadores en el Sistema Nervioso Central, hemos demostrado la utilidad del modelo para estudiar las diversas características farmacológicas y cinéticas de estos receptores, así como las diversas condiciones que intervienen en la regulación del mecanismo molecular de la acción de estos receptores.

## REFERENCIAS

- Biziere, K. y Coyle, J.T. (1978a). Effects of kainic acid on ion distribution and ATP levels of striatal slices incubated in vitro. J. Neurochem. 31: 513-520.
- Biziere, K. y Coyle, J.T. (1978b). Localization of receptors for kainic acid on neurons in the innernuclear layer of retina. Neuropharm. 18: 409-413.
- Cervetto, L. y Piccolino, M. (1974). Synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells in the turtle retina. Science. 183: 417-419.
- Coombs, J.S., Eccles, J.C. y Fatt, F. (1955). The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneuronal membrane that produce the inhibitory postsynaptic potential. J. Physiol. Lond. 130: 326-373.
- Cooper, J.R., Bloom, F.G. y Roth, R.H. (1970). The Biochemical Bases of Neuropharmacology. Oxford University Press, Londres.
- Coyle, J.T., Biziere, K. y Schwarcz, R. (1978). Neurotoxicity of excitatory amino acids in the neural retina. En: Kainic Acid as a Tool in Neurobiology. (E.G. McGeer et al., Eds.) Raven Press, Nueva York. p. 177.
- Curtis, D.R. (1969). Amino acid transmitters in mammalian Central Nervous System. Proc. 4th Int. Congr. Pharm. 1:9.
- Curtis, D.R., Hosli, L. y Johnston, G.A.R. (1968). A pharmacological study of the depression of spinal neurons by glycine and related amino acids. Exp. Brain Res. 6: 1-18.
- De Robertis, E. (1981). Receptores de las membranas sinápticas. Localización y propiedades. Medicina (Buenos Aires). 41: 815-821.
- Dowling, J.E. (1979). Information processing by local circuits: The vertebrate retina as a model system. En: The Neurosciences: Fourth Study Program. (Schmitt, P.O. y Worden, F.G. Eds.). MIT Press, Cambridge, MA. p. 163-182.
- Dowling, J.E. y Ripps, H. (1973). Effect of magnesium on horizontal cell activity in the skate retina. Nature (Lond). 242: 101-103.
- Dvorak, D.R. y Morgan, I.G. (1983). Intravitreal kainic acid permanently eliminates OFF-pathways from chick retina. Neurosci. Lett. 36: 249-254.
- Ehinger, B. y Falck, B. (1971). Autoradiography of some suspected neurotransmitter substances: GABA, glycine, glutamic acid, histamine, dopamine, and L-DOPA. Brain Res. 33: 157-172.

- Enna, S.J. y Snyder, S.H. (1976). Properties of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptor binding in mammalian retina. Brain Res. 115: 174-179.
- Fricke, V. (1975). Tritosol: A new scintillation cocktail based on Triton X-100. Anal. Biochem. 63: 555-558.
- Gershenfeld, H.M. y Piccolino, M. (1979). Pharmacology of the connections of cones and L-horizontal cells in the vertebrate retina. En: The Neurosciences: Fourth Study Program. (Schmitt, P.O. y Worden, F.G. Eds.). MIT Press, Cambridge, MA. p. 213-226.
- Hagins, W.A. (1979). Excitation in vertebrate photoreceptors. En: The Neurosciences: Fourth Study Program. (Schmitt, P.O. y Worden, F.G. Eds.). MIT Press, Cambridge, MA. p. 183-192.
- Harvey, J.A. y McIlwain, H. (1968). Excitatory amino acids and cation content in sodium ion flux of isolated tissues from the brain. Science. 188: 1084-1089.
- Hökfelt, T., Jonsson, G. y Lindbrink, P. (1970). Electron microscopic identification of monoamine nerve ending particles in rat brain homogenates. Brain Res. 22: 147-151.
- Johnston, G.A.R. (1979). Central Nervous System receptors for glutamic acid. En: Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology. (L.J. Filer Jr. y col. Eds.). Raven Press, Nueva York, p. 177-185.
- Johnston, G.A.R., Curtis, D.R., Davies, J. y McCulloch, R.N. (1974). Spinal interneuron excitation by conformationally restricted analogues of L-glutamic acid Nature. 248: 804-805.
- Kennedy, A.J. y Voaden, M.J. (1974). Distribution of free amino acids in the frog retina. J. Neurochem. 15: 833-841.
- López-Colomé, A.M. (1981). High affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. Neurochem. Res. 6: 1019-1033.
- López-Colomé, A.M. y Somohano, F. (1982). Characterization of [L- $^3$ H]aspartate binding to chick retinal subcellular fractions. Vision Res. 22: 1495-1501.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, W.J., Fatt, A.L. y Randall, R.S. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- McGeer, P.L., Eccles, J.C. y McGeer, E.G. (1978). Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain. Plenum Press, N.Y. USA.
- McGeer, E.G., Olney, J.W. y McGeer, P. (1978). Kainic Acid as a Tool in Neurobiology. Raven Press, Nueva York.

- McLennan, H. (1970): Synaptic Transmission. (W.B. Saunders, Eds.) Philadelphia p. 78-101.
- Miller, A.M. y Schwartz, E.A. (1983). Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors in the toad retina. J. Physiol. 334: 325-349.
- Morgan, I.G. (1983) Excitatory amino acid pathways in vertebrate retina. En: 9th Meeting Int. Soc. for Neurochem., Vancouver, J. Neurochem. (suppl. 1983). 41: S92 A.
- Morgan, I.G. e Ingham, C.A. (1981). Kainic acid affects both plexiform layers of chick retina. Neurosci. Lett. 21: 275-280.
- Murakami, M., Ohtsu, K. y Ohtsuka, T. (1972). Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina. J. Physiol. Lond. 227: 899-913.
- Murakami, M., Ohtsuka, T. y Shimosaki, H. (1975). Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina. Vision Res. 15: 456-458.
- Neal, M.J. (1976). Amino acid transmitter substances in the vertebrate retina. Nature. 251: 331-333.
- Neal, M.J. y Atterwill, C.K. (1974). Isolation of photoreceptor and conventional nerve terminals by subcellular fractionation of rabbit retina. Nature (Lond). 251: 331-332.
- Neal, M.J., Collins, G.G., y Massey, S.C. (1979). Inhibition of aspartate release from the retina of the anaesthetised rabbit by stimulation with light flashes. Neurosci. Lett. 14: 241-245.
- Neal, M.J. y White, R.D. (1971). Uptake of  $^{14}\text{C}$ -L-glutamate by rat retina. Br. J. Pharm. 43: 442-443.
- Nistri, A. y Constanti, A. (1979). Pharmacological characterization of different types of GABA and glutamate receptors in vertebrates and invertebrates. En: Progress in Neurobiology. Vol. 13. p. 177-235. Pergamon Press.
- Okamoto, K. y Quastel, J.H. (1970). Water uptake and energy metabolism in brain slices from the rat. Biochem. J. 120: 25-36
- Olney, J.W., Ho, O.L. y Rhee, V. (1971). Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse Central Nervous System. Exp. Brain Res. 14: 61-76.
- Rose, S.P.R. (1973). Cellular compartmentation of metabolism in the brain. En: Metabolic Compartmentation in the Brain. (R. Balázs y J.E. Cremer Eds.). Mcmillan, Londres. p. 287-304.

- Rubin, R.P. (1970). The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. Pharmacol. Rev. 22: 389-428.
- Sharif, N.A. y Roberts, P.J. (1980). Problems associated with the binding of L-glutamic acid to synaptic membranes: Methodological aspects. J. Neurochem. 34: 779-784.
- Shinozaki, H. y Konishi, S. (1970). Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurons. Brain Res. 24: 368-371
- Schwarcz, R. y Coyle, J.T. (1977). Kainic acid: neurotoxic effects after intraocular injection. Invest. Ophthalmol. 16: 141-148.
- Starr, M.S. (1973). Effect of dark adaptation on the GABA system in the retina. Brain Res. 59: 331-338.
- Svaetichin, G. y Mac Nichol, E.F. (1958). Retinal mechanism for chromatic and achromatic vision. Ann. N.Y. Acad. Sci. 72: 385-404
- Thomas, N.T. y Redburn, D.A. (1978). Uptake of  $^{14}\text{C}$ -aspartic acid and  $^{14}\text{C}$ -glutamic acid by retinal synaptosomal fractions. J. Neurochem. 31: 63-68.
- Trifonov, Y.A. (1968). Study of the synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells by means of electrical stimulation of the retina. Biofizika. 13: 809-817.
- Van den Berg, C.J. (1973). A model of compartmentation in mouse brain based on glucose and acetate metabolism. En. Metabolic Compartmentation in the Brain. (R. Balázs y J.E. Cremer Eds.). Macmillan, Londres. p. 137-166.
- Van den Berg, C.J. y Garfinkel, D. (1971). A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. Biochem. J. 123: 211-218.
- Van den Berg, C.J., Krzalic, Lj., Mela, P. y Wealsch, H. (1969). Compartmentation of glutamate metabolism in brain. Evidence for the existence of two different tricarboxylic acid cycles in brain. Biochem. J. 113: 281-290.
- Watkins, J.C. (1978). Excitatory amino acids. En: Kainic Acid as a Tool in Neurobiology. (Mc. Geer y col. Eds.). Raven Press, Nueva York p. 37-69.
- Werman, R. (1966). Criteria for identification of a Central Nervous System transmitter. Comp. Biochem. Physiol. 18: 745-766.
- White, R.D. y Neal, M.J. (1976). The uptake of L-glutamate by the retina. Brain Res. 111: 79-83.

Yoneda, Y. y Kuriyama, K. (1980). Presence of a low molecular weight endogenous inhibitor of  $^3\text{H}$  muscimol binding in synaptic membranes. Nature. 285: 670-673.

Zaczek, R., Koller, K., Cotter, R., Heller, D. y Coyle, J. R. (1983). N-Acetylaspartylglutamate: An endogenous peptide with high affinity for a brain "glutamate" receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 1116-1119.