

2ej
11j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

EL ACIDO GLUTAMICO COMO POSIBLE
NEUROTRANSMISOR EN LA VIA RETINO-
TECTAL DE LA RANA.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G O
P R E S E N T A :

PATRICIA ARAIZA BAHENA

México, D. F.,

1986



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.

EL ACIDO GLUTÁMICO COMO POSIBLE NEUROTRANSMISOR
EN LA VIA RETINO-TECTAL DE LA RANA.

Introducción.

- I.- La comunicación neuronal en el Sistema Nervioso.
 - I.1 La neurona.
 - I.2 La sinapsis.
 - I.3 Identificación de neurotransmisores.
 - I.4 El ácido glutámico como neurotransmisor.

- II.- La retina.
 - II.1 Morfología.
 - II.1.1 Tipos celulares.
 - II.1.2 Capas plexiformes.
 - II.2 Proyecciones del nervio óptico a los centros visuales.
 - II.2.1 Terminales ópticas en el diencéfalo.
 - II.2.2 Terminales ópticas en el mesencéfalo.

- III.- El tectum óptico.
 - III.1 Morfología.
 - III.1.1 Tipos celulares.
 - III.2 Conexiones aferentes tectales.
 - III.2.1 Proyecciones retino-TECTALES.
 - III.2.2 Proyecciones no-retinales.
 - III.3 Conexiones eferentes tectales.
 - III.4 Sinaptología del tectum.

- IV.- Objetivos.

- V.- Materiales y Métodos.
- V.1 Enucleación unilateral de larana.
- V.2 Obtención del tejido tectal.
- V.3 Determinación de los niveles del ácido glutámico endógeno.
- V.4 Liberación de Glutámico y GABA tritiados.

- VI.- Resultados.
- VI.1 Niveles del ácido glutámico endógeno.
- VI.2 Liberación de $|^3\text{H}|$ -L-Glutámico y $|^3\text{H}|$ -GABA a diferentes intervalos de tiempo.

- VII.- Discusión.

- VIII.- Conclusiones.

- IX.- Referencias.

INTRODUCCIÓN.

Los animales necesitan para su sobrevivencia un abastecimiento continuo de información acerca de lo que pasa en el mundo externo y dentro de su propio cuerpo. La función del Sistema Nervioso es la de proveer a su poseedor de dicha información y de la capacidad de integrarla y analizarla para dar una respuesta conveniente ante los estímulos internos y externos.

El grado en que se puede procesar la información en los centros nerviosos varía enormemente en los diferentes organismos y puede involucrar desde una respuesta refleja simple, hasta circuitos más complicados capaces de regir la habilidad para el pensamiento conceptual en el hombre. Sin embargo, a pesar de las diferencias existentes en la organización del Sistema Nervioso en cada especie animal, sus constituyentes unitarios -las neuronas- y la forma en que se interconectan -la sinapsis- son similares.

Para llegar a comprender las bases neuronales que rigen la transmisión y el procesamiento de la información en el Sistema Nervioso, un punto importante es la identificación de aquellas sustancias químicas -los neurotransmisores- que median la comunicación neuronal en una sinapsis específica.

Este trabajo se ha centrado en la identificación de una sustancia con un posible papel como neurotransmisor en una vía específica, la retino-tectal. Se eligió el sistema visual de la rana como modelo por su relativa accesibilidad y porque resulta interesante tratar de integrar a los estudios anatómicos, fisiológicos y conductuales que se han desarrollado, el conocimiento de los neurotransmisores que participan en el procesamiento de la información visual en los anfibios.

I.- La comunicación neuronal en el sistema nervioso.

En 1886 His y Forel sugirieron que el sistema nervioso está constituido por unidades discretas, las neuronas. Más tarde fueron apoyados fuertemente por Ramón y Cajal, quien estableció que las conexiones funcionales entre las células nerviosas individuales se efectuaba por contactos estrechos y no por la continuidad de una red sincicial como lo propuso la teoría reticular de Gerlach y Golgi (Eccles, 1959). Sherrington en 1897 denominó sinapsis a estas áreas especializadas de comunicación (Eccles, 1959).

I.1 La neurona.

Las neuronas poseen formas y tamaños muy diversos, sin embargo ciertas características les son comunes, en ellas se puede distinguir tres partes principales: a) el pericarión, soma o cuerpo celular donde descansa el núcleo y otros organelos celulares; b) el axón una proyección somática que transmite la señal nerviosa en dirección centrífuga, que puede ser corta como en neuronas locales o recorrer largas distancias antes de formar una terminal sináptica y hacer contacto ya sea con otras neuronas o con células efectoras como las del músculo, glándulas u órganos eléctricos; c) Las dendritas, proyecciones somáticas que pueden ramificarse más o menos profusamente y que junto con el soma recibe la mayoría de las señales transmitidas por las demás neuronas. (Ver figura Nº 1).

Existe además en el sistema nervioso otro tipo celular, las células de la neuroglía, muy diverso en cuanto a su forma, tamaño y función. Entre las funciones que se sabe realiza están las de dar soporte estructural a las neuronas e efectuar fagocitosis y mantener relaciones metabólicas con las neuronas.

I.2 La sinapsis.

La membrana de la neurona posee un gran significado funcional, es selectivamente permeable a los diferentes iones del medio intra y extracelular por lo que provoca un desequilibrio químico de Na^+ y K^+ que la polariza. Así la membrana tiene en su parte interna un valor aproximado de -70 mV con respecto al exterior, valor que puede disminuir -hiperpolarización- o aumentar -depolarización- por efecto de estímulos fisiológicos. Una depolarización que alcance el valor umbral de excitación genera un potencial de acción o impulso nervioso, que es transmitido por el axón hacia su terminal sináptica.

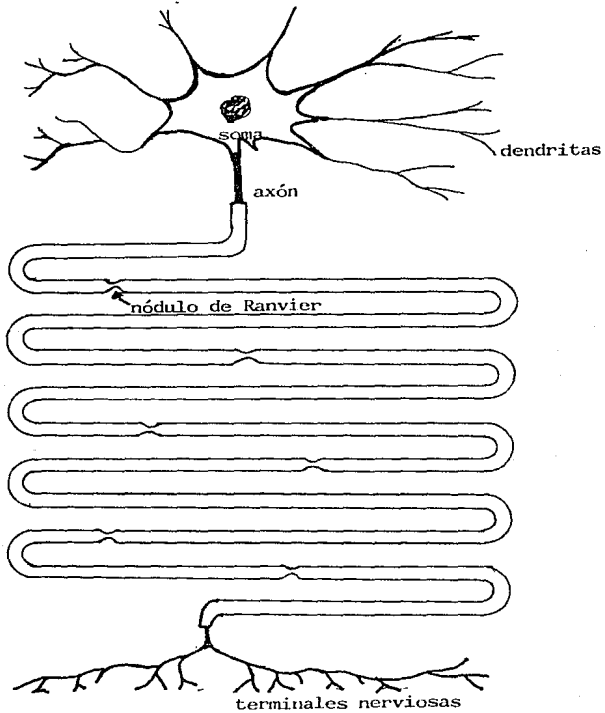


Figura Nº 1. Esquema de una neurona y una sinapsis típica.

La sinapsis es la unidad anatómica y funcional exclusiva de las células nerviosas que permite la comunicación entre las diferentes neuronas o entre éstas y diferentes tipos celulares, ya sea por medios eléctricos o químicos.

La sinapsis eléctrica difunde directamente la corriente generada por un impulso nervioso en la terminal presináptica a la siguiente neurona a través de una vía de baja resistencia. En el microscopio electrónico los sitios de comunicación eléctrica entre las células se pueden identificar como uniones comunicantes (gap junction) en las cuáles el espacio intercelular se reduce a 20 nm. Las sinapsis eléctricas se han asociado a respuestas reflejas rápidas, en invertebrados.

La sinapsis química está típicamente representada por la membrana presináptica con su contenido de vesículas sinápticas, el espacio intersináptico de 200 nm y la membrana postsináptica con su mecanismo especial receptivo y reactivo (ver figura N°1). El modelo de la transmisión nerviosa medida por una sustancia química, a la que se le denomina neurotransmisor, se debe en mucho a los trabajos de Loewi en el corazón de rana y de Dale y colaboradores en los nervios motores del músculo esquelético de mamíferos (citados por Sandoval y Lara, 1983). Los estudios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos realizados a mediados de siglo dieron origen al siguiente esquema de la transmisión nerviosa de tipo químico:

El arribo de un impulso a la terminal presináptica promueve la entrada de iones Ca^{++} que disparan la liberación del mediador químico, éste se difunde a través del espacio sináptico donde interacciona con su receptor postsináptico específico e induce un cambio en la permeabilidad de la membrana a uno o más iones. De esta manera si se da un aumento en la permeabilidad a los iones Cl^- y K^+ se provoca una hiperpolarización (sinapsis inhibitoria), en cambio un aumento en la permeabilidad al Na^+ produce una depolarización (sinapsis excitatoria) en la que el potencial generado está graduado en amplitud y duración por la cantidad de neurotransmisor liberado, este potencial puede sumarse espacial y temporalmente de tal manera que si alcanza el valor umbral genera un nuevo potencial de acción. El transmisor o es reaccumulado por la presinapsis a través de un sistema de transporte de alta afinidad o es inactivado enzimáticamente (ver fig.2).

Los neurotransmisores que modifica directamente la conductancia de la membrana se denominan ionotrópicos y los que ejercen su acción a través de nucleótidos cíclicos (cAMP o cGMP) como segundos mensajeros para provocar la apertura de los canales iónicos directamente o a través de proteínas fosforiladas se denominan metabotrópicos.

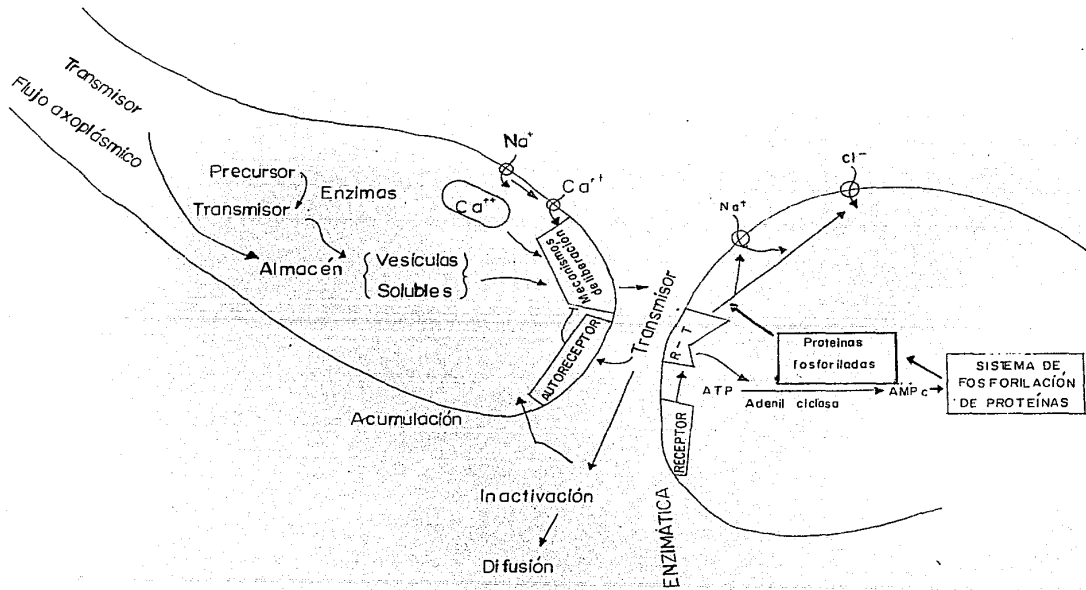


Figura Nº 2. Eventos involucrados en una sinapsis de tipo químico (Tomado de Sandoval y Lara, 1983)

I.3 Identificación de neurotransmisores.

La necesidad de identificar a los mediadores químicos en el sistema nervioso de vertebrados, llevó a Werman en 1966 (citado por Sandoval y Lara 1983) a tratar de formalizar los criterios para la identificación de neurotransmisores. Estos criterios se pueden resumir como sigue.

-El transmisor propuesto debe estar presente en la neurona en la que se postula que actúa como mediador, dentro de una poza metabólica accesible a la liberación y que como en el caso de los aminoácidos puede ser independiente de la poza relacionada con su papel en el metabolismo.

-El transmisor putativo debe modificar la conductancia iónica de la membrana a través de los mismos mecanismos que el transmisor natural.

-Debe estar presente un sistema de enzimas determinantes de la síntesis del transmisor postulado dentro de las terminales sinápticas.

-El transmisor putativo debe ser liberado de manera dependiente de Ca^{++} por depolarización.

-Debe existir un sistema de recaptura o degradación enzimática que elimine al transmisor una vez efectuada su acción.

-Los agentes farmacológicos (antagonistas y agonistas) que interactúan con el transmisor natural deben hacerlo de la misma forma con el transmisor putativo.

I.4 El ácido glutámico como neurotransmisor.

El ácido glutámico es un aminoácido no esencial que puede ser sintetizado principalmente a partir de dos vías: desde glucosa y otros precursores por medio del ciclo de los ácidos tricarbónicos o a partir de glutamina por medio de la enzima glutaminasa (ver figura N°3).

La alta concentración del glutámico en el cerebro reportada por Waelsch en 1951 (citado por López Colomé, 1983), la existencia de un sistema de captación de alta afinidad dependiente de Na^{+} en el cerebro y medula espinal (Balcarr y Johnston, 1973) y el hecho de que el ácido glutámico aplicado ionotópicamente, tiene un poderoso efecto sobre la mayoría de las neuronas del Sistema Nervioso Central (Curtis y Johnston, 1976) llevó a considerar su posible papel como mediador químico en la transmisión nerviosa. Sin embargo, ya que este aminoácido tiene un papel importante en el metabolismo celular, su postulación

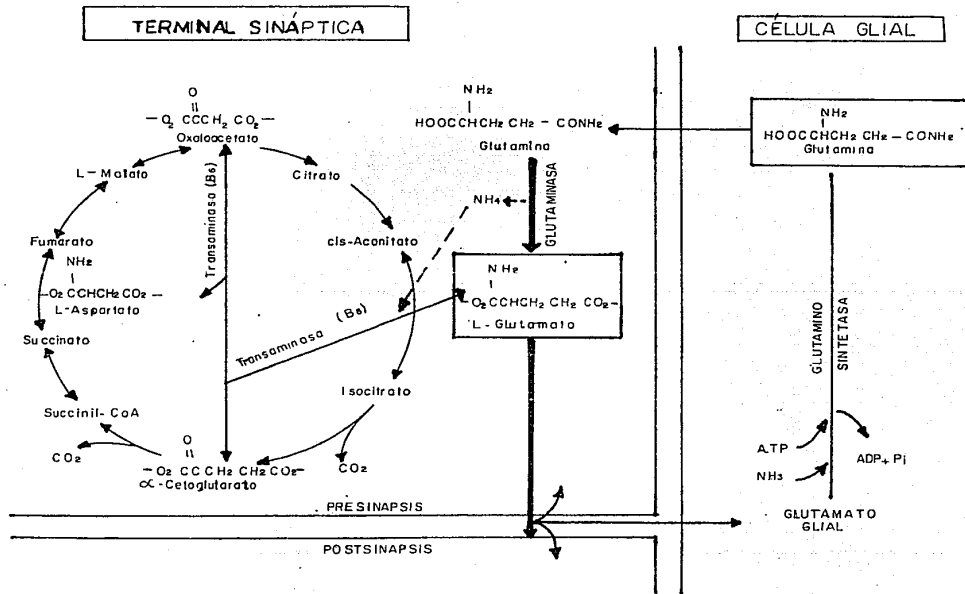


Figura Nº 3. Reacciones metabólicas y compartimentalización del ácido glutámico (Tomado de López Colomé, 1983).

como neurotransmisor se frenó hasta que fue posible demostrar la existencia de un compartimiento metabólico en el cuál la glutamina funciona como precursor del ácido glutámico destinado a la transmisión (Van Der Berg, 1970; Shank y Aprison, 1977).

Se cree que durante la transmisión sináptica se da una interacción dinámica entre las células gliales y las neuronas glutamatérgicas ya que se ha reportado que la glia posee un sistema de captación de alta afinidad de glutámico (Shank et al, 1973) y se sabe que es en las células gliales donde se localiza principalmente la glutaminosintetasa que transforma el glutámico en glutamina (Shank y Aprison, 1977).

Entre las dificultades para demostrar el papel del ácido glutámico como neurotransmisor está la falta de antagonistas y agonistas específicos, así como su aparente acción inespecífica, ya que casi todas las células del Sistema Nervioso Central responden a la aplicación iontoforética de este aminoácido. Debido a esto, la liberación del ácido glutámico dependiente de Ca^{++} es una de las mejores pruebas de que una vía dada lo emplea como transmisor (López Colomé, 1983; Freeman y Norden, 1984).

II.- La retina.

El gran tamaño de los ojos y los centros visuales de la rana con respecto al cuerpo y al resto del cerebro a llevado a considerar que la percepción visual juega un papel sumamente importante en la interrelación diaria de este animal con su medio.

De toda la gama de conductas guiadas visualmente las más estudiadas son la captura de la presa y la huida ante un objeto amenazante. Así Ingle (1983) con base en datos anatómicos, fisiológicos y conductuales propone que cada vía retinofugal dentro del Sistema Nervioso Central, activa una forma de conducta altamente estereotipada con su propio paquete de estímulos liberadores.

El interés de este trabajo se centra en la identificación de la sustancia con propiedades de neurotransmisor, involucrada en una de estas vías: la retino-tectal. En este capítulo y el siguiente se dará un breve esbozo de las dos estructuras conectadas por esta vía.

II.1 Morfología.

La retina es la más interna de las tres tunicas que forman la pared del globo ocular y constituye el componente nervioso del ojo. En los anfibios tiene un grosor en la parte central de 0.26 a 0.3 mm y en la periferia de 0.16 a 0.2 mm y su forma es la de una semiluna.

La retina posee tres tipos celulares conectados secuencialmente: receptores- células bipolares- y células ganglionares, con conexiones horizontales por medio de las células horizontales y las células amácrinas (Dowling, 1976). Al paquete de elementos presinápticos que se conectan con una célula ganglionar se le llama unidad receptiva.

Existe además un tipo de células gliales denominadas fibras de Müller que se extienden desde la capa limitante externa hasta la capa limitante interna y se ramifica formando una malla.

Los cuerpos celulares de las neuronas retinales se localizan en tres capas: La nuclear externa, la nuclear interna y la capa de células ganglionares. Las sinapsis están arregladas en dos capas plexiformes (ver la figura N^o4).

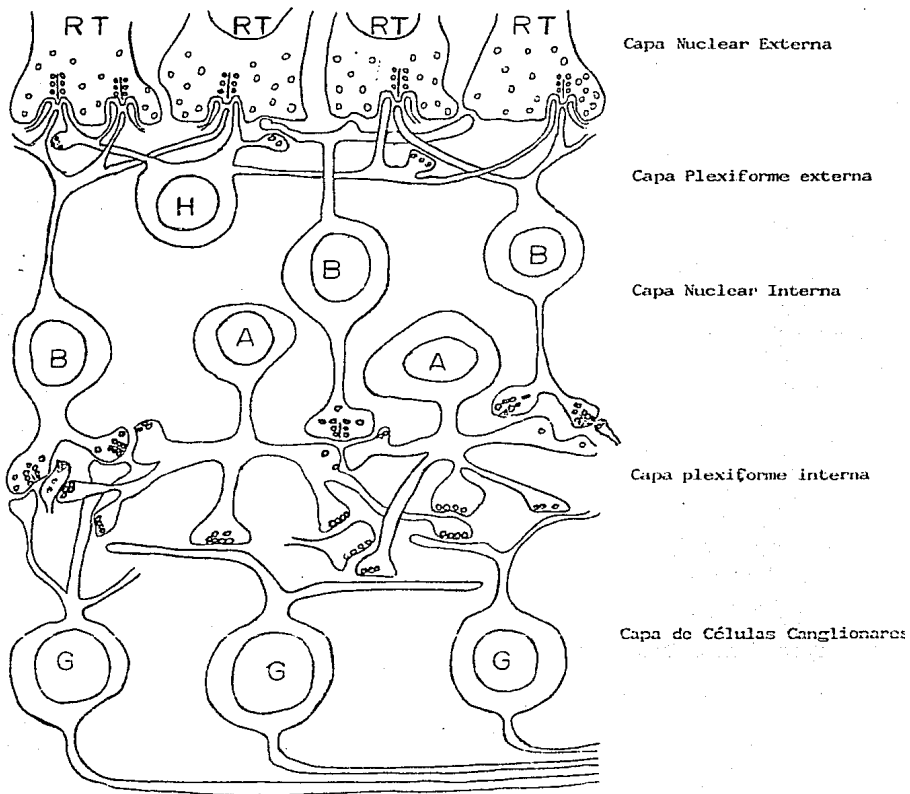


Figura Nº 4. Organización sináptica de la retina de la rana. RT, terminales de receptores; H, célula horizontales; B, células bipolares; A, células amacriñas; G, células ganglionares. Dowling, 1968 (Tomado de Massicu, 1985).

II.1.1 Tipos celulares.

Shultze en 1867 (citado por Donner y Reuter, 1976) describió tres tipos de receptores en la retina de rana: el bastón rojo con un pico de absorción máxima a 502 nm; el cono simple con un pico de absorción a 580 nm; y el cono doble con un componente principal que presenta un pico de absorción a 580 nm, y un componente accesorio cuyo pico de absorción no se reporta. Más tarde Schwalbe en 1874 (citado por Donner y Reuter, 1976) añadió la descripción de los bastones verdes con un pico de absorción a 433 nm, que son característicos de los anfibios.

Los cuerpos celulares de estos fotoreceptores están localizados en la capa nuclear externa. Sus terminales se distribuyen en la capa plexiforme externa donde los filamentos basales de los bastones rojos se sitúan superficialmente, los filamentos de los conos en la parte media y los de los bastones verdes en la parte más profunda (Donner y Reuter, 1976).

La descripción de las siguientes neuronas se basa en los trabajos de Ramón y Cajal de 1894 (citado por Dowling, 1976).

Las células horizontales se dividen en externas e internas, las horizontales externas tienen un soma pequeño y se localizan en la zona más distal de la capa nuclear interna, el soma de las células horizontales internas es más grande y las dendritas son más cortas. Ambos tipos poseen un axón corto.

Las células bipolares se clasifican en externas o grandes, con el cuerpo celular ubicado distalmente dentro de la capa nuclear interna, o en células bipolares internas o pequeñas ubicadas más proximalmente. Ramón y Cajal encontró que las células bipolares con árboles dendríticos anchos están conectadas a bastones rojos, las bipolares con campos dendríticos estrechos a conos y el resto de las bipolares a ambos tipos de receptores.

Las células amácrinas son muy variadas en su morfología dendrítica, pero se pueden dividir en dos grandes grupos: células estratificadas en uno, dos y a veces tres niveles discretos en la capa plexiforme interna, en las cuales se extienden sus procesos dendríticos; y células difusas cuyos procesos se extienden a través de varios niveles en la capa plexiforme interna. Los somas de estas células carecen de axón y se localizan en la capa nuclear interna.

Las células ganglionares forman una capa nuclear en la retina. Ramón y Cajal las clasificó en once subtipos de acuerdo a la región de la capa plexiforme interna en las que sus terminales dendríticas forman contacto sináptico con las terminales de las células bipolares y de las amácrinas.

II.1.2 Capas plexiformes.

En la capa plexiforme externa las terminales de los fotorreceptores forman sinapsis de tipo listón, con un "listón" denso a los electrones, rodeado de vesículas sinápticas localizado próximo a una invaginación de la terminal donde se insertan generalmente dos procesos postsinápticos, que pueden ser dendritas de células horizontales y bipolares. Esta capa contiene también sinapsis "convencionales" entre células horizontales y entre horizontales y bipolares. Existen además contactos superficiales entre células bipolares y pedículos de los fotorreceptores (Michael, 1976). Esta capa plexiforme es más delgada y mucho menos compleja que la capa plexiforme interna (Dowling, 1976)

En la capa plexiforme interna las células bipolares hacen contacto sináptico, de tipo listón, con dos elementos postsinápticos que pueden ser dos procesos de células amácrinas en la mayoría de los casos, o con un proceso de célula amácrina y uno de célula ganglionar. Muchos de los procesos sinápticos de células amácrinas alimentan a la terminal bipolar en un arreglo sináptico recíproco (Michael, 1976). En esta capa existe extensas interacciones sinápticas entre procesos de células amácrinas, se ha observado sinapsis seriadas de dos, tres o más procesos (Dowlin, 1976). Existen además contactos sinápticos "convencionales" entre los procesos de células amácrinas y dendritas de células ganglionares.

Aparentemente las células amácrinas son verdaderas interneuronas que se interponen entre las terminales de células bipolares y las dendritas de células ganglionares, y a cuyas numerosas interacciones Dowling (1976) atribuye que la respuesta de las células ganglionares de la retina sea mucho más compleja en la rana, que en vertebrados superiores. De hecho, la retina de la rana es capaz de interpretar los estímulos visuales, no sólo en términos de la distribución de la luz, como los primates, sino en cuanto a la forma, tamaño, movimiento y dirección del estímulo.

II.2 Proyecciones del nervio óptico a los centros visuales.

Los axones de las células ganglionares de la retina forman dos tractos de fibras ópticas cruzadas: a) el tracto óptico principal o marginal que lleva a la mayoría de las fibras ópticas hacia los centros visuales diencefálicos y al tectum óptico; y b) el tracto óptico accesorio posterior, una pequeña rama que se separa del nervio óptico principal a la altura del quiasma óptico y que termina en el núcleo óptico basal.

Las aferentes retinales al diencefalo y al mesencefalo han sido descritas y confirmadas por medio de diferentes técnicas: por degeneración terminal (Scalia et al., 1968; Lázár y Székely, 1969); por autorradiografía (Levine, 1978; 1980; Goldberg y Kotani, 1967) y; por transporte transneuronal de la peroxidasa de rábano (Wilczynsky y Zakon, 1982; Lázár, 1976). A continuación se dará un resumen de las eferentes descritas por estos autores, las cuales se pueden visualizar en la figura N° 5.

II.2.1 Terminales ópticas en el diencefalo.

En el tálamo anterior se distinguen dos regiones de neuropilo en su orilla lateral, el núcleo de Bellonci y el cuerpo geniculado lateral, donde las terminales ópticas contactan con dendritas de varias células localizadas más medialmente.

El núcleo de Bellonci tiene la forma de un cono invertido y alargado, su base descansa sobre la superficie más externa del diencefalo y su eje se dirige posteroventromedialmente. El cono está formado por un plexo de fibras mielínicas que envainan un corazón de fibras amielínicas. Contralateralmente las terminales ópticas invaden la parte ventrolateral del neuropilo, mientras que ipsilateralmente es innervado en menor grado en la parte dorsolateral.

El cuerpo geniculado tiene forma ovoide y se extiende más posteromedialmente al núcleo de Bellonci. La parte dorsal de su polo rostral esta en contacto con la superficie ventral del núcleo de Bellonci. Los neuropilos están parcialmente separados por una extensión lateral de materia gris. La innervación contralateral es la más importante y se concentra en la parte dorsolateral, las fibras retinales ipsilaterales están confinadas a la parte dorsomedial de su área.

El núcleo talámico posterior está localizado en el margen anterior del tectum óptico y se considera como parte de la región pretectal, está separado de los dos neuropilos anteriores por una zona media-talámica. Tiene forma cilíndrica y su eje longitudinal está orientado en dirección dorsoventral. Recibe principalmente terminales del nervio óptico contralateral, aunque la parte posteroventral recibe también innervación ipsilateral.

El núcleo pretectal de células grandes se localiza inmediatamente posterior al núcleo talámico posterior, está formado por un grupo indefinido de células grandes tendidas a lo largo de una línea extendida entre las divisiones media y lateral del tracto óptico, al nivel en que se separa para circundar el tectum, recibe innervación únicamente contralateral.

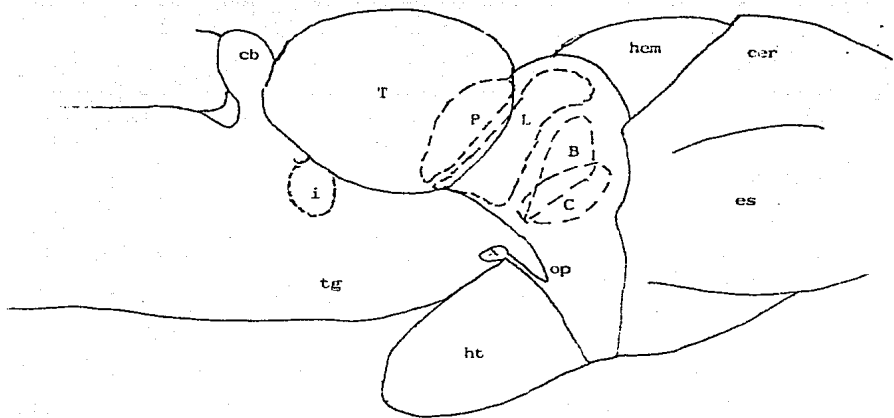


Figura Nº 5. Diagrama del lado derecho del cerebro de la rana que muestra con líneas punteadas los segmentos de los neuropilos talámicos: posterior (P), lateral (L), y anteroventral (B y C) que se asocian a las proyecciones de la retina. B. núcleo de Bellonci; C, cuerpo geniculado lateral; cb, cerebelo; i, núcleo ítsnico; tg, tegmentum; ht, hipotálamo; T, tectum óptico; x, núcleo óptico basal; op, tracto óptico; hem cer, hemisferios cerebrales; es, estriado. (Scalia, 1976).

El núcleo pretectal uncinado descansa medial al núcleo talámico posterior, pero lateral a las células de la zona periventricular. Su forma es la de un cilindro estrecho que se extiende posteroventralmente. Las fibras retinales que lo inervan son principalmente contralaterales, pero recibe una contribución importante del ojo ipsilateral.

La retina inerva a cada una de estas estructuras de manera retinotópica (Scalia y Fite, 1974).

II.2.2 Terminales ópticas en el mesencéfalo.

El tectum óptico es el área más importante inervada por las terminales de las células ganglionares de la retina y será descrita con detalle en el capítulo III.

El tracto óptico accesorio inerva contralateralmente y de manera retinotópica al núcleo óptico basal. Esta estructura está localizada sobre la cara ventral del tallo cerebral, inmediatamente posterior al nivel de separación del hipotálamo y el cerebro medio.

III.- El tectum óptico.

El tectum óptico de los anuros ha sido considerado un centro visumotor importante, que integra varias modalidades sensoriales, Por lo menos dos conductas distintas provocadas por estímulos visuales son mediadas por esta estructura (Ingle, 1983): La orientación hacia un estímulo identificado como presa y la huida ante un objeto amenazante. aunque otros centros visuales, aferentes al tectum ejercen una influencia modulatoria igualmente importante sobre las células tectales y por tanto sobre la conducta de la rana.

El tectum ocupa la parte dorsal del mesencéfalo, su tamaño equivale a cerca de dos veces el del diencefalo y a un tercio de la masa de los lóbulos telencefálicos. Está constituido por dos lóbulos ópticos ovoides, cada lóbulo forma una bóveda sobre el ventrículo mesencefálico, sus bordes dorsomediales son contiguos desde la mitad hacia el polo posterior y en su mitad anterior están separados por una región de materia gris.

III.1 Morfología.

Cada lóbulo tectal tiene una estructura laminada consistente de nueve capas plexiformes y celulares alternativas (ver figura Nº 6). Para describir las se usarán los números arábigos (1-9) para las capas principales, empezando desde el interior de acuerdo a Gaupp, 1899 (citado por Lázár, 1984) y las letras mayúsculas (A-G) para las láminas fibrosas que Potter (1969) localizó en la capa más externa.

La capa 1 es una lámina simple de células endimogliales con procesos rectos y largos que se extienden hacia la superficie. Las capas 2, 4 y 6 están compuestas de células piramidales y piriformes densamente empaquetadas, Las capas 3 y 5 son plexiformes y las constituyen las dendritas basales de las células piriformes y piramidales, los axones descendentes de algunas neuronas superficiales y fibras aferentes del tegmentum del cerebro medio y del tectum contralateral.

La capa 7 es plexiforme y contiene principalmente fibras mielínicas gruesas que corren paralelamente unas de otras en dirección mediolateral y se le considera la vía principal de las fibras eferentes tectales. En la superficie de la capa 6 y por debajo de la capa 8 se localizan dos hileras de células ganglionares grandes. La capa 8 está constituida por los somas de neuronas piriformes,

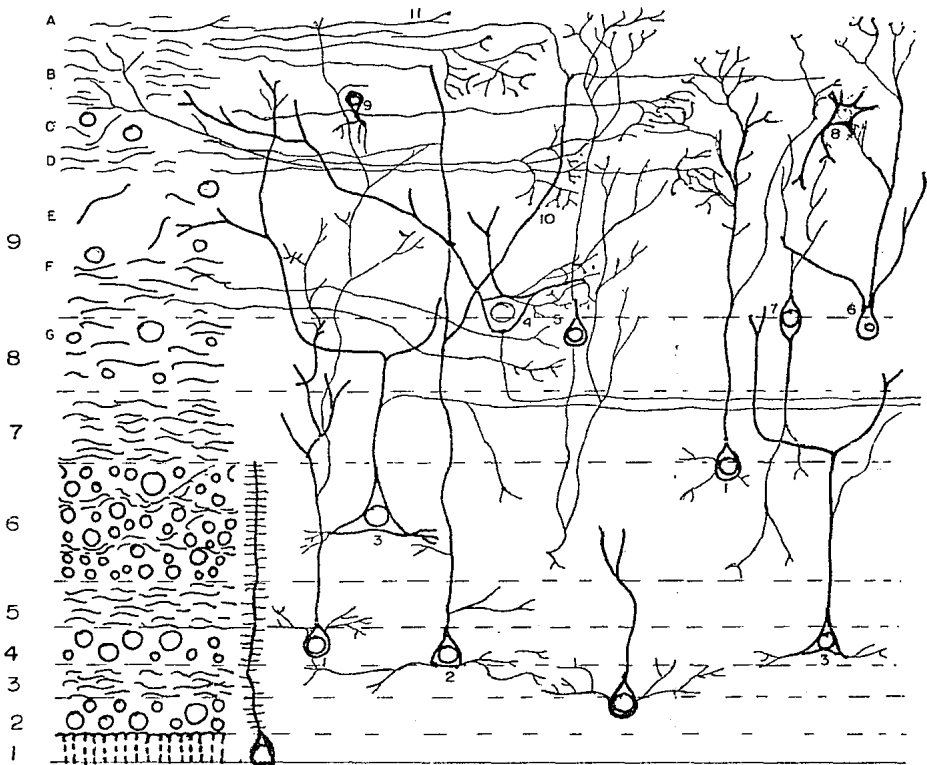


Figura Nº 6. Representación esquemática de la organización laminar del tectum óptico y sus principales tipos neuronales. 1, célula piriforme grande con apéndices dendríticos y axón ascendente; 2, célula piriforme grande con colaterales dendríticas; 3, célula piramidal con axón eferente; 4, célula ganglionar con axón eferente; 5 y 6, células piriformes pequeñas con axones descendente y ascendente respectivamente; 7, célula bipolar vertical; 8, célula estrellada; 10, terminales ópticas; 11, supuestas terminales de aferentes diencefálicas. (Tomado de Székely y Lázár, 1976).

piramidales pequeñas y células bipolares. La capa 9 ocupa más de un tercio del grosor del tectum, contiene los procesos dendríticos de casi todas las neuronas tectales, numerosos axones ascendentes y terminales aferentes retinales y diencefálicas, tiene además esparcidas células amácrinas y estrelladas. Potter (1969) divide esta capa en 6 láminas (A-G), de éstas Székely y Lázár (1976) consideran a las láminas B, D y F como plexiformes y a las láminas C y E como celulares con unas cuantas fibras mielínicas y separadas de las anteriores. La lámina A es la más superior en la parte anterior del tectum, pero se desvanece hacia el polo posterior donde la lámina B constituye la parte más superficial del tectum.

III.1.1 Tipos celulares.

En el tectum se pueden distinguir siete tipos diferentes de neuronas (Székely y Lázár, 1976; Lázár, 1984).

Las células piriformes son los principales constituyentes de la capa 2, 4 y 6 poseen un pericarión esférico u ovoide y se han descrito dos tipos: neuronas con árboles dendríticos angostos en la capa 9 y neuronas con árboles dendríticos amplios que empiezan a ramificarse en la capa 7. En ambos tipos el axón termina dentro de la arborización.

Las células piriformes pequeñas constituyen la capa 8, su pericarión es más pequeño pero similar al de las piriformes grandes de las capas periventriculares. Los axones de estas células descienden a la capa 7, regresan bruscamente y ramifican entre los somas celulares en la capa 8 o 9. Se las considera neuronas locales, sin embargo, Lázár et al (1983) describe dos tipos de neurona piriformes pequeñas proyectivas cuyos axones se reúnen con las fibras eferentes que dejan el tectum en la capa 7.

Las células fuciformes o bipolares poseen dos dendritas principales que se originan de polos opuestos. Las bipolares de la capa 8 están orientadas perpendicularmente a la superficie y su axón desciende a la capa 6, las neuronas bipolares de la capa 9 se orientan paralelas a la superficie tectal y su axón desciende a la profundidad de la capa 9.

Las células piramidales se localizan en las capas periventriculares del tectum, principalmente en la capa 6, su pericarión es piramidal u ovoide, la dendrita apical se ramifica en la capa 7 y el axón abandona al tectum desde la misma capa, se le considera la eferente principal del tectum.

Las células ganglionares son las neuronas más grandes del tectum, están esparcidas en la superficie de la capa 6, en la 7 y en la parte más superficial de la 8. Dos dendritas principales se dirigen hacia la superficie tectal, sus axones se dirigen a la capa 7 y se les considera el segundo elemento eferente del tectum.

Las células amácrinas y estrelladas son las más pequeñas y las menos numerosas, se les localiza esparcidas en la capa 9. Las células estrelladas poseen unas cuantas dendritas cortas y un axón corto. Las células amácrinas tienen un solo proceso dendrítico y aparentemente carecen de axón.

Además se pueden distinguir tres tipos de células gliales: las células ependimogliales que forman una línea ininterrumpida alrededor del ventrículo óptico, y en número reducido los astrocitos y las células de microglia, estas últimas se multiplican después de la remoción de un ojo.

III.2 Conexiones aferentes tectales.

III.2.1 Proyecciones retino-tectales.

El nervio óptico penetra al tectum contralateralmente. En la rana las fibras mielínicas gruesas se localizan en las láminas B, D, F y G de la capa 9 y los axones amielínicos de diámetro pequeño en las láminas C y E, la capa A no posee fibras retinales (Potter, 1972; Matsumoto y Scalia, 1981). Todas las fibras mielínicas degeneran dentro de los 26 días siguientes a la remoción del ojo contralateral. Östeberg y Norden (1979) reportan que esta degeneración empieza a ser importante al cuarto día de que la enucleación se realiza. Las fibras amielínicas degeneran más lentamente (Matsumoto y Scalia, 1981; Lázár, 1980).

La proyección retino-tectal está retinotópicamente organizada. En la pupila de la rana dos diámetros oblicuos uno de otro y rotados 45° de los diámetros horizontal y vertical, definen los cuadrantes temporal (posterior), dorsal (superior), nasal (anterior) y ventral (inferior) de la retina. Scalia y Pite (1974) demostraron que el cuadrante nasal proyecta a la parte posteromedial del tectum, el cuadrante ventral al anteromedial, el cuadrante temporal al anterolateral y el cuadrante dorsal al posterolateral del tectum en Rana pipiens.

Neary en 1976 (citado por Lázár, 1984) con base en un estudio autorradiográfico, demostró una proyección ipsilateral pequeña de la retina a la lámina F del tectum.

II.2.2 Proyecciones no retinales.

Al estudiar las proyecciones tálamo-tectales, Trachtenberg e Ingle (1974) encontraron que el cuerpo geniculado lateral proyectaba ipsilateralmente a la lámina A y las capas periventriculares del tectum, y propone a este neuropilo como su principal aferente talámica.

Wilczynsky y Northcut (1977) encontraron aferentes ipsilaterales provenientes del núcleo pretectal de células grandes y el núcleo talámico postero-central, en tanto que el núcleo posterolateral pretectal proyecta contralateralmente al tectum.

Aparentemente las proyecciones talámicas regulan la actividad de las neuronas tectales. Ingle (1983) reporta que una lesión en el tálamo caudal, que incluya al núcleo pretectal, produce la desinhibición de la conducta alimenticia de la rana de tal manera que las ranas tiran un lengüetazo a cualquier objeto que se mueva en su campo visual sin importar su tamaño.

Wilczynsky y Northcutt (1977) reportan además entradas al tectum desde el núcleo suprapeduncular, de la oliva superior, del tegmentum mesencefálico de la espina cervical y del núcleo istmíco, este último forma conexiones istmo-talámicas recíprocas y topográficamente distribuidas (Gruberg y Udin, 1978).

En los anuros no se han reportado entradas telencefálicas características de los demás vertebrados.

III.3 Conexiones eferentes tectales.

La información eferente del tectum fluye principalmente de los axones que parten de la capa 7 del tectum. Rubinson (1968) describe una vía eferente principal constituida por tres componentes: primero un componente ascendente que viaja dentro del tracto óptico marginal, a nivel caudal del quiasma óptico, cruza la línea media en la decusación postóptica y gira caudalmente para reunirse al tracto óptico marginal lateral del ojo contralateral. Sus terminales se distribuyen en el neuropilo lateral del tálamo bilateralmente, el cuerpo geniculado lateral, la región postquiasmática del hipotálamo, la porción ventral del pretectum y el tegmentum mesencefálico.

El segundo componente viaja alrededor de la periferia del mesencéfalo, atraviesa la línea media rostral del núcleo interpeduncular, gira caudalmente e inerva contralateralmente la medula espinal. Algunas terminales difusas se localizan en la formación reticular media de manera contralateral.

El tercer componente descendente ipsilateral es el más pequeño y llega hasta el núcleo itsmíco, la oliva superior y la formación reticular lateral.

III.4 Sinaptología del tectum.

En el tectum se pueden distinguir tres tipos de terminales axónicas (Lázár, 1984; Székely, 1971):

Las terminales de tipo 1 generalmente se agrupan para formar pequeñas islas sinápticas, se localizan en las láminas B-F. Estas terminales establecen contactos asimétricos con dendritas y apéndices dendríticos, un gran número de éstas degeneran de los cinco a los diez días después de que el ojo es removido y por tanto se han identificado como terminales de axones retinales.

Las terminales de tipo 2 son proliferaciones redondas u ovaladas con pocas vesículas sinápticas y están distribuidas en la capa 9. Forman sinapsis con dendritas de citoplasma transparente, apéndices dendríticos y parcialmente con cuerpos celulares. Se cree que pertenecen a fibras aferentes no retinales de diversos orígenes ya que su número relativo aumenta 30 días después de que se remueve el ojo contralateral.

Las terminales de tipo 3 son las más pequeñas, tienen forma redonda u oval, generalmente forman contactos sinápticos simétricos, pero las hay que forman contactos asimétricos. Los dos tipos contactan con dendritas y con somas, probablemente la mayoría pertenecen a axones de células tectales.

Con base en su estructura Lázár (1984) también distingue dos tipos de dendritas:

Las dendritas convencionales pueden tener citoplasma transparente, pocas mitocondrias, neurofilamentos y cuerpos multivesiculares, forman paquetes compactos en la capa 7 y se cree que pertenecen a células piramidales o piriformes. En la capa 9 son elementos postsinápticos de diferentes axones y de dendritas presinápticas. Las dendritas convencionales también pueden presentar citoplasma obscuro por la presencia de microtubulos, gránulos de glicógeno, ribosomas y segmentos cortos de retículo endoplasmático, se cree que pertenecen a células de las capas 8 y 9 porque no se han encontrado en capas más profundas.

Las dendritas presinápticas presentan una estructura similar a la de las convencionales, pero la parte dilatada de la dendrita generalmente sostiene una especialización presináptica. Se cree que las dendritas presinápticas transparentes pertenecen a las células tectales periventriculares y a aquellas células

de la capa 8 cuyo axón no puede reconocerse. Las dendritas presinápticas obscuras, probablemente pertenezcan a células amácrinas o estrelladas.

No se ha podido correlacionar con certeza a la mayoría de las dendritas con el tipo celular al que corresponden y por tanto se desconocen las relaciones sinápticas de varios tipos celulares. Sin embargo se han propuesto algunos posibles circuitos tectales con base en observaciones a través del microscopio electrónico en animales normales y en animales con un ojo enucleado. La figura 7 muestra una unidad funcional hipotética propuesta por Lázár (1984):

Cuando se estimula un gran número de células ganglionares retinales, el elemento eferente (la célula piramidal) puede ser activado directamente aunque es más probable que sea disparado por medio de una interneurona. La neurona B puede ser estimulada por medio de sus dendritas o apéndices dendríticos por varios sistemas aferentes. Su axón puede influenciar la actividad de las dendritas de la célula piramidal o proyectar a la capa 9 y establecer una línea de retroalimentación positiva a través de sinapsis dendrodendríticas con la neurona F. La excitación de la neurona B puede propagarse a B' por medio de apéndices dendríticos y viceversa. B' puede activar una neurona estrellada, que a su vez inhiba a las dendritas de la neurona B (línea de retroalimentación negativa). Se puede establecer un circuito reverberante que involucre a las neuronas A, E y D y que resulte en una estimulación repetitiva de las dendritas de la neurona proyectiva C. Una neurona estrellada, puede por medio de su axón, inhibir a la neurona D y bloquear el circuito reverberante. Las influencias tegmentales o espinales pueden abastecer a la unidad funcional a través de la neurona E o de las dendritas presinápticas de la neurona F. Como resultado de todas estas operaciones las células piramidales pueden descargar y la actividad de toda la red se codificará según el patrón de disparo del axón de la célula piramidal.

Se han construido otras redes hipotéticas con las neuronas tectales, sin embargo no se cuenta aún con modelos más confiables.

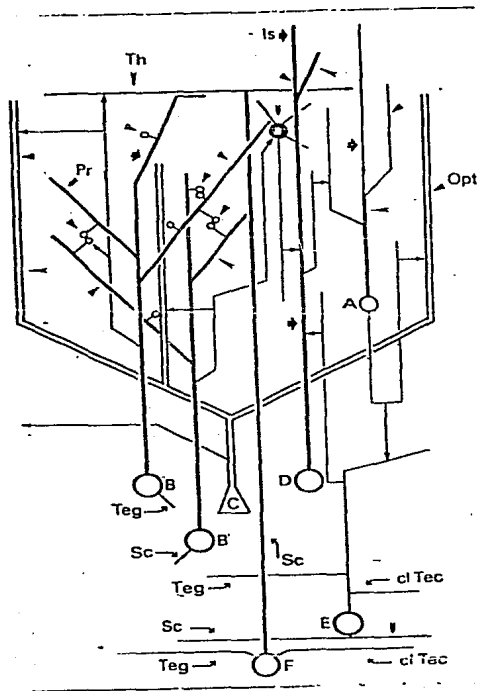


Figura Nº 7. Unidad funcional hipotética en el tectum óptico de la rana. A, célula piriforme pequeña; B, B', células piriformes pequeñas con árboles dendríticos amplios interconectados por apéndices (anillos pequeños); C, célula piramidal el elemento eferente de la unidad; D, célula piriforme grande con árbol dendrítico estrecho; E, célula piriforme grande con dendritas en las capas periventriculares; F, célula amácrina en la capa 2. Las líneas delgadas con flechas representan axones. Terminales: Opt, ópticas, Pr, pretectales; Sc, espinales; cl Tec, del tectum contralateral; Teg, tegmentales; Is, itsmícas y; Th, talámicas. En el texto la explicación del funcionamiento de la unidad. (Tomado de Lázár, 1984).

IV.- Objetivos.

La anatomía y las conexiones neuronales del sistema visual de los anfibios han sido objeto de estudios exhaustivos. Por tanto, el estudio y reconocimiento de los mediadores químicos involucrados en la circuitería tectal es de importancia fundamental para entender las bases neuronales de la percepción visual y la integración sensoriomotora en estos animales.

Como antecedente de este trabajo, Massieu (1985) usó como criterios la captación dependiente de Na^+ y la liberación dependiente de Ca^{++} de diferentes aminoácidos marcados radioactivamente, para sugerir que el ácido glutámico, la glicina y el ácido gama-amino-butírico (GABA) podrían ser neurotransmisores en el tectum óptico de los anuros. Además, se ha descrito un sistema de transporte de alta afinidad para el glutámico en preparaciones de sinaptosomas en el tectum de rana (Yates y Roberts, 1974), así como una reducción significativa de los niveles de glutámico endógeno en ranas con enucleación unilateral (Yates y Roberts, 1974; Roberts y Yates, 1976). Sin embargo, Milson y Mitchel (1977) consideran al glutámico como un aminoácido con acción excitatoria inespecífica en el tectum.

El objetivo de este trabajo es evaluar el papel del ácido glutámico como posible neurotransmisor en las terminales ópticas que inervan el tectum. Para ello se comparó el efecto causado por la enucleación de un solo ojo sobre los niveles del glutámico endógeno y la liberación dependiente de Ca^{++} del ácido glutámico tritiado, en los lóbulos tectales de Rana berlandieri. La liberación se ensayó a intervalos de sobrevivencia de 10, 17 y 33 días postoperatorios, con el fin de correlacionar el curso temporal de la pérdida de las terminales ópticas, con el efecto causado sobre la liberación del glutámico, a través del tiempo.

Paralelamente se estudio el efecto de la enucleación sobre la liberación de GABA tritiado, que es un transmisor inhibitor (Tapia, 1983) que se libera de manera dependiente de Ca^{++} en esta preparación (Massieu, 1985) y que por tanto se consideró un buen control de la técnica para medir la liberación que se usó aquí.

V.- Materiales y Métodos.

V.1 Enucleación unilateral de la rana.

Las ranas Rana berlandieri forreira se anestesiaron en una atmósfera de éter. Se les enucleó el ojo derecho cortando los músculos orbitales y el nervio óptico lo más cercanamente posible al globo ocular, se desinfectó con Benzal en dilución 1:100 y se suturó sobre la órbita. Las ranas se mantuvieron en jaulas con agua a temperatura ambiente (aproximadamente 20° C) durante periodos de 10, 17 y 33 días, en este tiempo se les alimentó con hígado de res cada tercer día.

V.2 Obtención del tejido tectal.

Para obtener los lóbulos tectales se decapitó a las ranas, se abrió el cráneo y rápidamente se extrajeron los tecta teniendo cuidado en mantener sepa rados el tectum ipsilateral (control) del tectum contralateral (denervado) al ojo enucleado. Todos los tejidos no-tectales se removieron en disección sobre hielo.

V.3 Determinación de los niveles del ácido glutámico endógeno.

Los tecta de una sola rana se homogenizaron en frío, por separado, en 1 ml de ácido perclórico al 6% en un homogenizador de mazo de teflón. Los homogenados se centrifugaron a 12,000 xg durante 10 minutos en una centrífuga Beckman modelo J2-21. El precipitado se resuspendió en 1 ml de NaOH 0.1 N y se congeló para la determinación posterior de proteínas. El sobrenadante se neutralizó a pH de 6.8 a 7.2 con 170 μ l de K_2CO_3 y se volvió a centrifugar a 12,000 xg durante 10 minutos para eliminar el perclorato precipitado.

Se tomaron muestras de 200 μ l del sobrenadante y se añadieron a un medio que contenía: Amortiguador de fosfatos 0.05 mM a pH 8.6; Amortiguador Tris-Acetato 0.05 mM a pH 8.6; Hidrazina 0.1 mM; Nicotinamida-Adenin Dinucleotido (NAD) 2 mM y; Adenosin 5-Difosfato (ADP) 2.5 mM en volumen total de 1 ml.

El medio se incubó a 20° C durante 5 minutos con el fin de que se estabilizara y se midió su densidad óptica (D.O.) a 340 nm en un espectrofotómetro Zeiss. Se le agregó de 2 a 4 unidades de Deshidrogenasa del Ácido Glutámico (GDH) de hígado de bovino y 2 minutos después se volvió a tomar la lectura de la D.O. del medio. El incremento en la D.O. provocado por la GDH se obtuvo restando a la última lectura la anterior a la aplicación de la enzima.

La concentración del ácido glutámico endógeno se calculó en términos de la reducción de NAD de acuerdo a la siguiente reacción:



Con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración del ácido glutámico} = \frac{\Delta \text{ D.O.}}{\text{C.E.M.}} \times \frac{\text{V.T}}{\text{V.M.}}$$

Donde:

Δ D.O. = Incremento en la densidad óptica provocado por la enzima.

C.E.M. = Coeficiente de extinción molar del NADH = 0.0063 cm²/nanomola
(Tomado de Ulrich, 1965).

V.T. = Volumen del homogenado inicial más el neutralizante (1,170 μ l).

V.M. = Volumen de la muestra (200 μ l).

Para poder expresar la concentración del aminoácido en función de la concentración de proteína presente en el tectum, los precipitados de proteína que previamente se congelaron se determinaron con el método de Lowry et al. (1951). La curva patrón para la determinación de proteína se obtuvo como sigue: se tomaron por duplicado muestras de 50, 100 y 200 μ l de una solución de albumina bovina 0.25 mg/ml y se llevó cada una a un volumen de 400 μ l con agua destilada, a cada muestra se le adicionaron 2 ml de una solución que contenía por cada 100 ml : 58 ml de NaCO₃ al 2% en NaOH 0.1 N, 1 ml de CuSO₄ al 1% y 1 ml de tartrato de sodio y potasio al 2%. Se dejó reposar diez minutos y se agregó 0.2 ml de reactivo de Folin en dilución 1:2, treinta minutos después se tomó la lectura de la densidad óptica a 500 nm, y por último se graficó la densidad óptica contra la concentración de albumina bovina. Las soluciones problema se descongelaron, se diluyeron veinte veces y se tomaron muestras de 0.4 ml a las que se procesó de la misma forma que a las muestras de la curva patrón. Con la densidad óptica de estas muestras se extrapoló de la curva patrón la concentración de proteína y se multiplicó por el factor de dilución para obtener la concentración total de proteína en el tectum. La concentración de glutámico obtenida anteriormente se dividió entre la concentración de proteína detectada en el tectum correspondiente.

V.4 Liberación de Glutámico y GABA tritiados.

A los 10, 17 y 33 días de haber enucleado unilateralmente a las ranas, se obtuvieron los lóbulos tectales y se hicieron rebanadas de 0.05 mm de espesor en una rebanadora de tejido Mc Ilwain. Las rebanadas se preincubaron a 21° C en un medio Krebs - bicarbonato que contenía: NaCl 115 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM y Glucosa 10 mM a pH 7.4 que se mantuvo con una mezcla de CO₂/O₂ (5%/95%). transcurridos cinco minutos de preincubación se añadió al medio 0.5 µCi de [³H]-L-Glutámico (1.6 µM en el volumen total de incubación) ó 0.33 µCi de [³H]-GABA (0.7 µM en el volumen de incubación) y ácido aminoxiacético 0.1 mM (concentración final) para evitar la degradación del GABA, y se incubó durante diez minutos a 21° C para permitir la captación de los aminoácidos.

Con una pipeta pasteur se transfirieron las rebanadas a unidades de filtración que contenían un disco milipore Bio Rad de 0.6 µm de diámetro en el poro. Las unidades se colocaron sobre una caja de acrílico que permitía la filtración por aplicación de vacío a una presión de 15 cm² de Hg y se lavaron dos veces por filtración con 5 ml de medio Krebs - bicarbonato sin CaCl₂ y con EGTA (ácido etilenglicol tetraacético) 1 mM para eliminar la radioactividad no captada por el tejido.

Las unidades se pasaron a un sistema de perfusión continua que permitía utilizar diferentes medios, impulsados independientemente por una bomba peristáltica Gilson Miniplus 2 y en el que se puede trabajar con 8 canales simultáneamente. Para este trabajo se emplearon 4 canales por experimento. Todas las rebanadas se perfundieron durante ocho minutos a temperatura ambiente en un medio Krebs - bicarbonato libre de calcio y con una velocidad de flujo de 1 ml/min con el fin de obtener la liberación basal de la radioactividad. A continuación se perfundieron todas las rebanadas ocho minutos más en las siguientes condiciones:

- Cámaras 1 y 2, tectum control y tectum denervado respectivamente en medio Krebs bicarbonato libre de calcio, con 53 mM de KCl (el NaCl se reduce a 53 mM).
- Cámaras 3 y 4, tectum control y tectum denervado respectivamente en medio Krebs bicarbonato que contenía 53 mM de KCl y 2 mM de CaCl₂.

De este modo se obtuvo para ambos tecta la línea basal de la liberación de radioactividad, la liberación del aminoácido debida a un agente depolarizante (alta concentración de potasio) y la liberación inducida por depolarización dependiente de Ca⁺⁺.

Todos los perfusados se colectaron cada minuto en frascos de centelleo y al final se les agregó como líquido de centelleo 5 ml de tritosol (Frike, 1975) y se cuantificó la radioactividad en un contador de centelleo para muestras líquidas Beckman LS 7 000 ó Packard Tri Carb 2425. Los filtros de las unidades se colocaron en frascos de centelleo con 1 ml de dodecil sulfato de sodio al 1% en EDTA (ácido etilen dinitrilo tetraacético) 20 mM a pH 8 ajustado con NaOH, durante 24 horas o durante 20 minutos a 70° C para romper las membranas del tejido. A los frascos ya fríos se les añadió 10 ml de tritosol y se cuantificó la radioactividad. Los resultados se expresaron como sigue:

$$\% \text{ de Eflujo} = \frac{\text{dpm colectados en el perfusado}}{\text{dpm colectados en el perfusado} + \text{dpm presentes en el tejido.}}$$

dpm = desintegraciones por minuto = cuentas por minuto del perfusado - cuentas por minuto del blanco / eficiencia del contador de centelleo.

El [³H]-L-Glutámico (actividad específica 45.8 Ci/nmol) y el [³H]-GABA (actividad específica 40.2 Ci/nmol) se adquirieron de New England Nuclear Corporation. La GDH extraída de hígado de bovino y libre de amonio, el NAD y el ADP de levadura se adquirieron de Sigma Chemical Co.

VI.- Resultados.

VI.1 Niveles del ácido glutámico endógeno.

En la tabla Nº 1 se puede observar que la concentración de glutámico de tectada por la técnica modificada de Hughey et al.(1980) es de 32.4 nmolas/mg de proteína en los tecta normales, en tanto que en los tecta denervados 10 días antes, en los que se presupone un pérdida importante de terminales ópticas se aprecia una reducción de aproximadamente el 40% con respecto a los controles ($P > 0.005$).

Tabla Nº 1

Tectum Control nmolas/mg de proteína	Tectum Denervado nmolas/mg de proteína
32.4 ± 0.96 (5)	19.5 ± 0.70 (6)

Determinación de los niveles endógenos de ácido glutámico en el tectum denervado y el tectum normal de ranas cuyo ojo derecho fue enucleado 10 días antes. Expresado en nmolas/mg de proteína (media ± error estandar). Entre parentesis el número de determinaciones. $P > 0.005$.

VI.2 Liberación de [^3H]-L-Glutámico y [^3H]-GABA a diferentes intervalos de tiempo.

El eflujo basal del ácido glutámico tritiado de las rebanadas del tectum se muestra sólo en los dos minutos anteriores al pulso depolarizante en las gráficas 1, 2 y 3. El minuto marcado como cero señala la aplicación del pulso depolarizante en presencia o en ausencia de calcio.

A intervalos de 10 y 17 días postoperatorios, los tecta control muestran un pico de liberación de glutámico inducida por la depolarización en presencia de calcio de 1.6 y 1.3 veces el eflujo basal, en tanto que cuando el calcio es eliminado el pico de liberación es de 0.8 y 0.70 veces la línea basal respectivamente (significancia de la diferencia 0.5 para ambos periodos).

Gráfico Nº 1

Eflujo de ácido glutámico [^3H] de rebanadas de tectum óptico de ranas con 10 días de sobrevivencia a la enucleación.
a) Efecto de 53 mM de KCl sin Ca^{+2} ; b) Efecto de 53 mM de KCl + CaCl_2 . O tectum control, ● tectum denervado.
a) Media \pm E.E. de 6 experimentos. b) Media \pm E.E. de 14 experimentos.

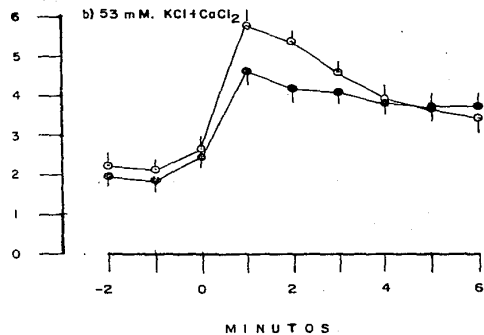
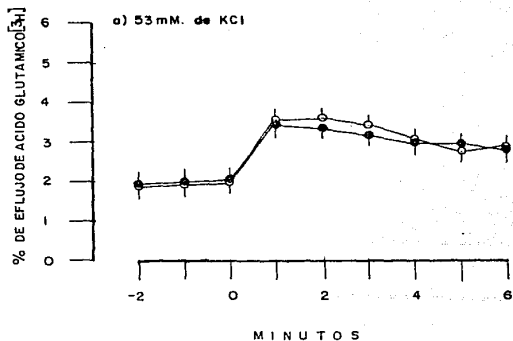


Gráfico NR 2

Eflujo de ácido glutámico [^3H] de rebanadas de tectum óptico de ranas con 17 días de sobrevivencia o la enucleación.

- a) Efecto de 53 mM. de KCl sin Ca^{++} , b) 53 mM. de KCl+2mM. de CaCl_2 , o tectum control, ● tectum denervada.
a) Media \pm E.E. de 4 experimentos. b) Media \pm E.E. de 10 experimentos.

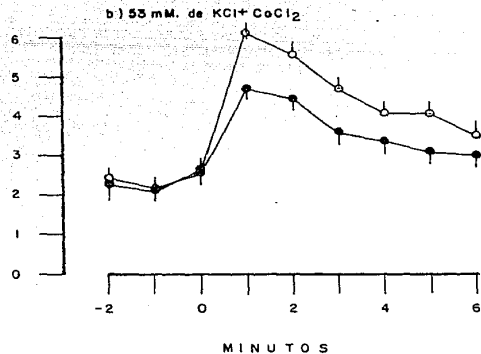
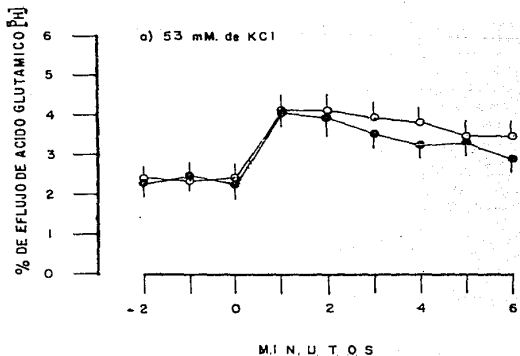
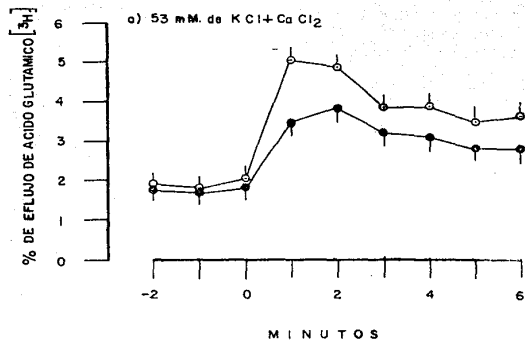


Gráfico Nº 3

Eflujo de ácido glutámico [^3H] de rebanadas de tectum óptico de ratas con 33 días de sobrevivencia a la enucleación.

a) Efecto de 53 mM. de $\text{KCl} + \text{CaCl}_2$. ○ tectum control, ● tectum denervado.

o) Media \pm E. E. de 7 experimentos.



En las gráficas 1a y 2a se observa que no existe diferencia en la liberación por depolarización del glutámico tritiado en ausencia de calcio entre ambos tecta por efecto de la enucleación unilateral, mientras que en las gráficas 1b, 2b, y 3, se aprecia una reducción aparente en los picos de liberación por depolarización en presencia de calcio en el tectum denervado con respecto al control. Debido a la variabilidad en el pico de liberación entre los experimentos individuales, no fue posible cuantificar de manera confiable esta reducción, así que, para visualizar mejor las diferencias entre las distintas condiciones en que se ensayó la liberación, se tomo para cada experimento la sumatoria del eflujo del $[^3\text{H}]$ -Glutámico después de dar el pulso depolarizante restando previamente a cada punto el último valor del eflujo basal y con estos datos se construyó la gráfica N° 4.

Con ayuda de la prueba estadística de Student se compararon las sumatorias del eflujo del aminoácido entre ambos tecta y entre las condiciones de presencia y ausencia de calcio. La tabla N° 2 muestra los resultados de esta prueba, con base en ellos se puede decir que:

- 1) Para los tecta control a 10 y 17 días de sobrevivencia postoperatoria existe una diferencia significativa ($P > 0.1$ y $P = 0.025$ respectivamente) entre los eflujos de glutámico en presencia y en ausencia de calcio, lo que indica que existe una liberación calcio - dependiente de este aminoácido.
- 2) El eflujo de $[^3\text{H}]$ -Glutámico inducido por el agente depolarizante en ausencia de calcio no fue diferente significativamente ($P < 0.1$) cuando se compararon los tecta control contra los denervados para 10 y 17 días de sobrevivencia, por lo que se puede concluir que la enucleación no afectó la liberación independiente de calcio inducida por depolarización.
- 3) A un intervalo de 10 días postoperatorios se observa una reducción no significativa ($P < 0.1$) del 13% cuando se compara la liberación de glutámico en presencia de calcio entre el tectum denervado y el control. En tanto que a intervalos de 17 y 33 días es bastante clara la presencia de una reducción del 27% ($P > 0.05$) y del 34% ($P > 0.025$) respectivamente en el tectum denervado con respecto al control.

Gráfico NR 4

El eflujo después del pulso depolarizante de $[^3H]$ glutámico menos el eflujo basal de rebonadas de tectum óptico de ranas con un ojo enucleado. a) 10, b) 17, y c) 33 días de sobrevivencia postoperatoria.

□ Tectum control. (+) Presencia.

■ Tectum denervado. (-) Ausencia.

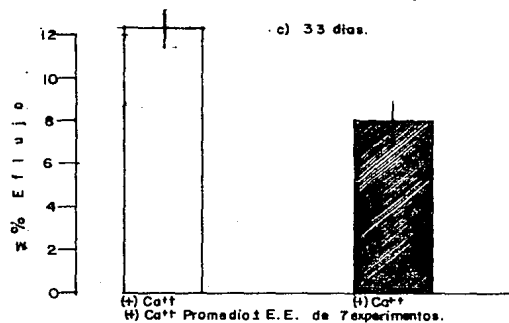
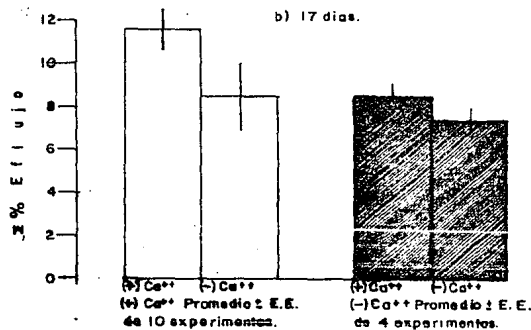
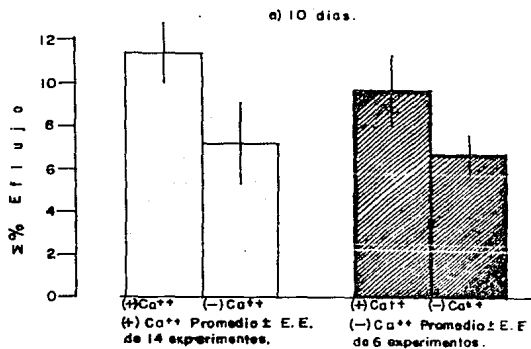


TABLA Nº 2.- Significancia obtenida por medio de la prueba de "t" cuando se comparan las condiciones experimentales en que se ensayó la liberación de [³H]L-Glutámico.

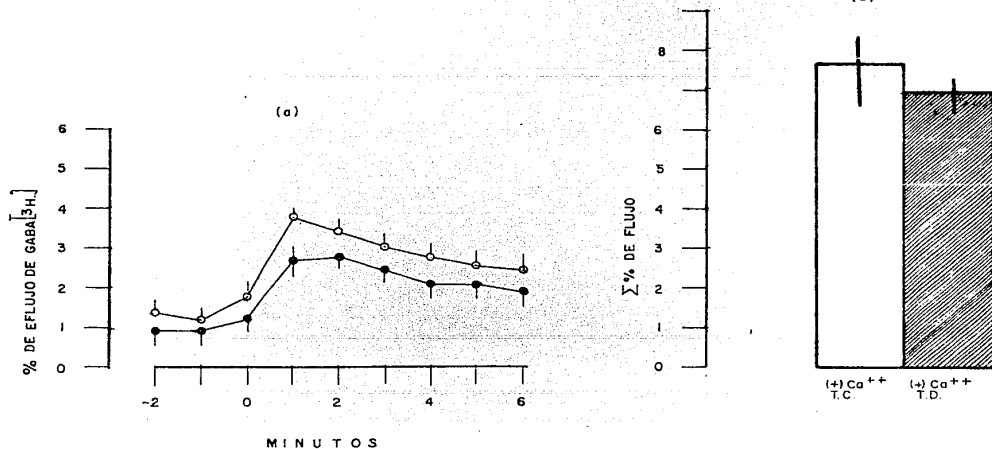
Tiempo de sobrevivencia postoperatoria.	Condición experimental que se compara.	Valores de P.
10 DIAS	Presencia de Ca ⁺⁺ Vs ausencia de Ca ⁺⁺ en tectum control.	0.05 > P > 0.1
17 DIAS	Presencia de Ca ⁺⁺ Vs ausencia de Ca ⁺⁺ en tectum control.	P = 0.025
10 DIAS	Presencia de Ca ⁺⁺ Vs ausencia de Ca ⁺⁺ en tectum experimental.	P < 0.1
17 DIAS	Presencia de Ca ⁺⁺ Vs ausencia de Ca ⁺⁺ en tectum experimental.	P < 0.1
10 DIAS	Tectum experimental Vs Tectum control en presencia de Ca ⁺⁺ .	P < 0.1
10 DIAS	Tectum experimental Vs tectum control en ausencia de Ca ⁺⁺ .	P < 0.1
17 DIAS	Tectum experimental Vs tectum control en presencia de Ca ⁺⁺ .	P > 0.05
17 DIAS	Tectum experimental Vs tectum control en ausencia de Ca ⁺⁺ .	P < 0.1
33 DIAS	Tectum experimental Vs tectum control en presencia de Ca ⁺⁺ .	P < 0.025

Como control de la técnica empleada para medir la liberación, se ensayó el efecto de la enucleación unilateral sobre la liberación del GABA en el tectum a los 10 días postoperatorios. En la gráfica 5a se muestra en la curva de liberación una reducción aparente de la liberación en presencia de calcio en el tectum denervado, sin embargo, al obtener la sumatoria del eflujo y tratar los resultados de la misma forma que a los anteriores (gráfica 5b) se encontró que esta reducción no era significativa ($P < 0.1$), por tanto se puede decir que la enucleación no afecta la liberación de GABA estimulada por depolarización en presencia de calcio a los 10 días postoperatorios.

Gráfica N° 5

a) Eflujo de $[^3\text{H}]$ GABA de rebanadas de tectum óptico de ranas con 10 días de sobrevivencia a la enucleación. Efecto de 53 mM. de $\text{KCL} + \text{CaCl}_2$. O tectum control, ● tectum denervado. Media \pm E.E. de 4 experimentos.

b) Sumatoria del eflujo de ^3H GABA despues del pulso depolarizante menos el eflujo basal en las mismas ranas. T.C. tectum control, T.D. tectum denervado.



VII.- Discusión.

Uno de los criterios para postular a una sustancia como neurotransmisor es su presencia en las neuronas que probablemente lo liberan. En el caso del ácido glutámico este criterio no es tan claro debido a su papel en el metabolismo energético, sin embargo se ha demostrado que su concentración es más elevada en el SNC que en otros tejidos (Waelsh, 1951 citado por López Colomé, 1983). En estudios sobre la variación regional de la concentración de aminoácidos en el cerebro de rana se ha reportado la existencia de niveles más altos del glutámico en el cerebro medio y en el tectum óptico que en otras regiones (Mitchel, Taberner y Yates, 1974; Yates y Taberner, 1976).

En un intento por correlacionar la degeneración de terminales nerviosas con una caída en la concentración de su transmisor, Yates y Roberts (1974) enuclearon el ojo izquierdo de ranas y reportaron en el tectum denervado una pérdida significativa de glutámico del 26% a los 7 días y del 30% a los 14 días posteriores a la enucleación. En este trabajo se encontró que existe una reducción del 40% en la concentración del ácido glutámico en el tectum óptico, cuando éste es denervado por la enucleación del ojo correspondiente 10 días antes. Esta reducción rápida en la concentración del aminoácido se correlaciona bien con una pérdida rápida de terminales ópticas en el tectum reportada por Östeborg y Norden (1979) y corrobora los estudios de Yates y Roberts (1974).

Otro criterio importante es la presencia de un sistema de remoción del transmisor del espacio sináptico, Shank et al. (1973) demostraron en el cerebro aislado de sapo un sistema de captación de alta afinidad para glutámico en neuronas, células gliales y sinaptosomas. Se ha reportado además la presencia de un sistema de captación de alta afinidad dependiente de Na^+ para el glutámico en el tectum óptico de la rana (Roberts y Yates, 1976; Massieu, 1985). Sin embargo, Roberts y Yates (1976) no encontraron efectos sobre la captación de alta afinidad de este aminoácido en el tectum, provocados por la enucleación unilateral y atribuyen esto a la presencia de un sistema de captación de alta afinidad del glutámico por la glia y por tanto no resulta inesperado que no sólo no exista una reducción en la captación, sino que se observe un ligero aumento a causa de la gliosis que la misma enucleación causa.

En un estudio previo Massieu (1985) demostró que el ácido glutámico es liberado de manera dependiente de Ca^{++} por el tectum óptico. En el presente trabajo se trató de evaluar el efecto que sobre dicha liberación provoca la enucleación unilateral y se encontró que:

- En los tecta normales se puede observar la existencia de una liberación dependiente de calcio del ácido glutámico, lo que corrobora lo reportado por Massieu (1985).

- Al comparar los tecta denervados con sus controles respectivos se encontró que la liberación en ausencia de calcio no sufrió alteración significativa en ningún período de tiempo. Dado que las células gliales proliferan después de la enucleación, es posible que este tipo de liberación no se vea afectado por la reducción de las terminales retinales, porque la glia sea capaz de liberar glutámico de manera independiente de calcio.

- La liberación en presencia de calcio, característica de los procesos neuronales (Mideli, 1973), no se vio afectada significativamente a los 10 días postoperatorios a pesar de que Østeberg y Norden (1979) reportan una pérdida de terminales retinales del 40% a los 5 días postoperatorios y a que en este trabajo reportamos una reducción del 40% en la concentración del glutámico a los 10 días de la enucleación. Aún cuando no podemos explicar el que no se vea afectada la liberación a este tiempo, lo que podría estar en contra de la postulación del glutámico como transmisor del nervio óptico, consideramos que la reducción en la liberación del glutámico en el tectum denervado con respecto al control a 17 y 33 días es bastante clara ($P > 0.05$ y $P > 0.025$ respectivamente) para suponer que dicha reducción es una evidencia más que apoya la posibilidad de que las terminales de las células retinales que inervan al tectum sean glutamatérgicas.

- La liberación en presencia de calcio no se redujo totalmente en ningún período postoperatorio debido tal vez a la persistencia de fibras ópticas, Matsumoto y Scalia (1981) reportan fibras ópticas amielínicas a las 6 semanas de la enucleación. Por otra parte no se elimina la posibilidad de que el tectum utilice el glutámico como transmisor en alguna conexión tectal local ó que alguna otra aferente tectal sea glutamatérgica.

La liberación de GABA inducida por depolarización y en presencia de calcio no mostró alteración cuando se comparó el tectum denervado con el control a los 10 días postoperatorios, tal como se esperaba por ser éste un transmisor inhibitorio y el nervio óptico una aferente excitatoria al tectum. Sin embargo, a períodos mucho más largos se podría encontrar alguna alteración en la liberación del GABA ya que Yates y Roberts (1974) reportan una pérdida en la concen-

tración de este aminoácido del 40% a los 41 días posteriores a la enucleación, atribuible a la degeneración transneuronal de células amácrinas o estrelladas. Si a partir de ésto se estudiara la distribución del GABA y de otros aminoácidos que se postula están presentes en el tectum, se ampliaría el campo de investigación sobre las bases neuronales de la integración visuomotora del tectum. Esta clase de estudios integrados a las investigaciones que se desarrollan paralelamente, sobre la anatomía y fisiología del sistema visual, podrían contribuir a dilucidar el proceso de la integración y análisis de los estímulos visuales que desembocan en una conducta determinada.

VIII.- Conclusiones.

Existen evidencias de que el ácido glutámico tiene un papel en la transmisión de tipo químico en el tectum, la alta concentración del aminoácido, la captación por un sistema de alta afinidad y la liberación dependiente de Ca^{++} . Sin embargo, esto no demuestra necesariamente que actúe en las terminales ópticas que inervan al tectum, para tal fin es de utilidad considerar las alteraciones que la denervación unilateral provoca. En este trabajo se ha corroborado que la enucleación de un solo ojo induce la caída de los niveles normales del ácido glutámico y se ha demostrado que aún cuando en un principio no es muy claro, existe un decremento significativo en la liberación dependiente de calcio en los tecta denervados a distintos periodos de tiempo. Esto demuestra que existe una alta probabilidad de que las terminales ópticas que inervan al tectum sean glutamatérgicas.

Para contribuir a la dilucidación de esta posibilidad resultaría de utilidad estudiar estos eventos y sus alteraciones en las distintas capas del tectum para localizar dentro de este centro visual las terminales glutamatérgicas. Además, el descubrimiento de antagonistas y agonistas específicos del glutámico será sin duda de gran ayuda para determinar la actuación de este aminoácido en el tectum.

Este trabajo representa un primer intento por reconocer a los mediadores químicos que actúan en vías específicas del tectum, lo que puede en un futuro integrarse a los conocimientos anatómicos y fisiológicos del sistema visual de la rana, de tal manera que se haga posible el entendimiento de la forma en que las vías nerviosas son capaces de integrar y analizar un estímulo externo para producir una respuesta motora adecuada.

IX.- Referencias.

- Balcar, V.J. y Johnstone, G.A.R., (1973), HIGH AFFINITY UPTAKE OF TRANSMITTERS: STUDIES ON THE UPTAKE OF L-ASPARTATE, GABA, L-GLUTAMATE AND GLYCINE IN CAT SPINAL CORD. J. Neurochem. 20: 529-539.
- Curtis, D.R. y Johnstone, G.A.R., (1974), AMINO ACID TRANSMITTERS IN THE MAMMALIAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM. Ergebn. Physiol. 69: 98-188.
- Donner, K.O. y Reuter, T., (1976), VISUAL PIGMENTS AND PHOTORECEPTOR FUNCTION, En: Frog Neurobiology (R. Llinás y W. Precht ed.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. pp: 251-277.
- Dowling, J.E., (1976), PHYSIOLOGY AND MORPHOLOGY OF THE RETINA. En: Frog Neurobiology (R. Llinás y W. Precht ed.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. pp: 278- 296.
- Eccles, J.C., (1959), NEURON PHYSIOLOGY, En: Handbook of Physiology, Section I Neurophysiology. American Physiological Society, Washington D.C. pp: 59-74.
- Feeman, J.A. y Norden, J.J., (1984), NEUROTRANSMITTERS IN THE OPTIC TECTUM OF MAMMALS, En: Comparative Neurology Of The Optic Tectum (H. Venegas ed.), Plenum Press, New York, London pp: 469-546.
- Frike, U., (1975), TRITOSOL: A NEW SCINTILLATION COCKTAIL BASED ON TRITON X 100. Analyt. Biochem. 63: 555-558.
- Goldberg, S. y Kotani, M., (1967), THE PROJECTIONS OF OPTIC NERVE FIBERS IN THE FROG Rana catesbiana AS STUDIED BY RADIOAUTOGRAPHY. Anat. Rec. 158: 325-332.

-Gruber,E.R. y Udin, S.B.,(1978), TOPOGRAPHIC PROJECTIONS BETWEEN THE NUCLEUS ISTHMI AND THE TECTUM OF THE FROG Rana pipiens. J. Comp. Neur. 179: 485-500.

- Hughey,P.R.,Rankin,B.B. y Curthoys,N.P.,(1980),ACUTE ACIDOSIS AND RENAL ARTERIOVENOUS DIFFERENCES OF GLUTAMINE IN NORMAL AND ADRENALECTOMIZED RATS. Am. Physiol. Soc. 238: F 199- F 204.

- Ingle, D.J.,(1983), BRAIN MECHANISM OF VISUAL LOCALITATION BY FROGS AND TOADS.En: Advances in Vertebrate Neuroethology (Ewert, J.P.; Capranica, R.R. y D.J. Ingle ed.) Plenum Press, Nueva York y Londres. pp: 177-226.

--Lázár,G. y Székely,G.,(1969), DISTRIBUTION OF THE OPTIC TERMINALS IN THE DIFFERENT OPTIC CENTRES OF THE FROG. Brain Res. 16:1-14.

- Lázár, G.,(1976), TRANSNEURONAL TRANSPORT IN THE FROG VISUAL SYSTEM. Brain Res. 109: 623-627.

- Lázár, G.,(1980), LONG TERM PERSISTENCE AFTER EYE-REMOVAL OF UNMYELINATED FIBRES IN THE FROG VISUAL PATHWAY. Brain Res. 199: 219-224.

- Lázár, G.;Tóth,P.;Csank,G.y Kiclier,E.,(1983), MORPHOLOGY AND LOCATION OF TECTAL PROJECTION NEURONS IN FROGS: A STUDY WITH HRP AND COBALT-FILLING. J. Com. Neur. 215: 108-120.

- Lázár, G.,(1984),STRUCTURE AND CONNECTIONS OF THE FROG OPTIC TECTUM, En: Comparative Neurology of the Optic Tectum (H. Venegas ed.) Plenum Press, Nueva York y Londres. pp: 185-210.

- Levine,R.L., (1978), AN AUTORADIOGRAPHIC ANALYSIS OF THE RETINAL PROJECTION IN THE FROG Xenopus laevis: NEW OBSERVATIONS IN ANURAN VISUAL PROJECTION. Brain Res. 148: 202-206.

- Levine, R.L.,(1980), AN AUTORADIOGRAPHIC STUDY OF RETINAL PROJECTION IN Xenopus laevis WITH COMPARATION TO Rana.: J. Comp. Neur. 189: 1-29.

- López Colomé A.M.,(1983), ACIDOS GLUTAMICO Y ASPARTICO, En: Aminoácidos y Péptidos en la Integración de Funciones Nerviosas, UNAM, México pp: 93-105.

- Lowry,O.H.;Rosenbrogh,N.J.;Farr,A.L. y Randall,J.,(1951), PROTEIN MEASUREMENT WHITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. J. Biol. Chem. 193:265-275.

- Massieu,M.L.,(1985), EL SISTEMA VISUOMOTOR EN ANFIBIOS: ESTADO ACTUAL DE CONOCIMIENTOS Y ESTUDIO EXPERIMENTAL DE ALGUNOS AMINO ACIDOS COMO NEUROTRANSMISORES. Tesis profesional de Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.

- Matsumoto,D.E. y Scalia,F., (1981), LONG TERM SURVIVAL OF CENTRALLY PROJECTING AXONS IN THE OPTIC NERVE OF THE TOAD (Bufo bufo). J. Anat. 92 :21-27.

-Michael,J.N.,(1976), AMINO ACID TRANSMITTER SUBSTANCES IN THE VERTEBRATE RETINA. Gen Pharmac. 7: 321-332.

- Miledi,R.,(1973),TRANSMITER RELEASE INDUCED BY INJECTION OF CALCIUM IONS INTO NERVE TERMINALS. Proc. R. Soc. Lond. B. 183:421-425.

-Milson,J.A y Mitchell,J.F.(1977). THE ACTION OF AMINO ACIDS ON EVOKED RESPONCES IN THE FRGG OPTIC TECTUM. Br. J. Pharmacol. 59(1): 484.

- Mitchel,J.F.;Taberner,P.V. y Yates,R.A.,(1974). REGIONAL DISTRIBUTION OF GLUTAMATE AND GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID AND THEIR ASSOCIATED ENZYMES IN THE FROG CENTRAL NERVOUS SYSTEM. Br. J. Pharmacol. 50 (2): 448-449.

- Östeberg, A. y Norden, J., (1979), ULTRAELECTRICAL STUDY OF DEGENERATION AND REGENERATION IN THE AMPHIBIANS TECTUM. Brain Res. 168: 441 - 455.
- Potter, H.D., (1969), STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF CELL AND FIBER POPULATIONS IN THE OPTIC TECTUM OF THE FROG (Rana catesbiana). J. Comp. Neur. 136: 203-232.
- Potter, H.D., (1972), TERMINAL ARBORIZATIONS OF RETINOTECTAL AXONS IN THE BULLFROG. J. Comp. Neur. 144: 269-284.
- Roberts, P.J. y Yates, R.A., (1976), TECTAL DEAFFERENTATION IN THE FROG: SELECTIVE LOSS OF L-GLUTAMATE AND AMINO BUTYRATE. Neurosc. 1: 371-374.
- Rubinson, K., (1968), PROJECTIONS OF THE TECTUM OPTICUM OF THE FROG. Brain Res. Evol. 1: 529-561.
- Sandoval, M.E. y Lara, R., (1983), PROPIEDADES GENERALES DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA. En: Aminoácidos y Péptidos en la Integración de Funciones Nerviosas. UNAM, México pp: 19-29.
- Scalia, F.; Knapp, H.; Halpern, M. y Riss, W., (1968). NEW OBSERVATIONS ON THE RETINAL PROJECTIONS IN THE FROG. Brain Behav. Evol. 1: 324-353.
- Scalia, F. y Fite, K., (1974), A RETINOTOPIC ANALYSIS OF THE CENTRAL CONNECTIONS OF THE OPTIC NERVE IN THE FROG. J. Comp. Neur. 158: 455-478.
- Scalia, F., (1976), THE OPTIC PATHWAY OF THE FROG: NUCLEAR ORGANIZATION AND CONNECTIONS. En: Frog Neurobiology (R. Llinás y W. Precht ed.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York pp: 386-406.
- Shank, R.P.; Whiten, J.T. y Baxter, C.F., (1973), GLUTAMATE UPTAKE BY THE ISOLATED TOAD BRAIN. Science 181: 860-862.

- Shank, R.P. y Aprison, M.H., (1977), GLUTAMINE UPTAKE AND METABOLISM BY THE ISOLATED TOAD BRAIN: EVIDENCE PERTAINING TO ITS PROPOSED ROLE AS A TRANSMITTER PRECURSOR. *J. Neurochem.* 28: 1189-1196.
- Székely, G., (1971), THE MESENCEPHALIC AND DIENCEPHALIC OPTIC CENTRES IN THE FROG. *Vis. Res. Suppl.* 3: 269-279.
- Székely, G. y Lázár, G., (1976), CELLULAR AND SINAPTIC ARCHITECTURE OF THE OPTIC TECTUM. En: *Frog Neurobiology* (R. Llinás y W. Precht ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York. pp:407-434.
- Tapia, R., (1983), EL ACIDO γ -AMINO BUTÍRICO, En: *Aminoácidos y Péptidos en la Integración de Funciones Nerviosas*. UNAM, México. pp: 57-70.
- Tranchtenberg, M.C. e Ingle, D., (1974), THALAMOTECTAL PROJECTIONS IN THE FROG. *Brain Res.* 79: 419-430.
- Van Der Berg, C.J., (1970), GLUTAMATE AND GLUTAMINA, En: *Handbook of Neurochemistry*, Vol. III (A. Lajtha ed.) Plenum Press, Nueva York y Londres. pp: 296-317.
- Wilczynski, W. y Northcutt, G., (1977), AFFERENTS TO THE OPTIC TECTUM OF THE LEOPARD FROG: A HRP STUDY. *J. Comp. Neur.* 173: 219-229.
- Wilczynski, W. y Zakon, H., (1982), TRANSCELLULAR TRANSFER OF HRP IN THE AMPHIBIAN VISUAL SYSTEM. *Brain Res.* 239: 29-40.
- Yates, R.A. y Roberts, P.J., (1974), EFFECTS OF ENUCLEATION AND INTRAOCULAR COLCHICINE ON THE AMINO ACIDS OF THE FROG OPTIC TECTUM. *J. Neurosc.* 1:371-374.
- Yates, R.A. y Taberner, P.V., (1976), GLUTAMIC ACID AND THEIR METABOLIZING ENZIMES IN THE FROG CENTRAL NERVOUS SISTEM. *Brain Res.* 84: 339-407.