



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**IZTACALA - UNAM
CARRERA DE BIOLOGIA**

B014/80 Ej. 3

BIOLOGIA.

**“EL ACIDO GLUTAMICO, NEUROTRANSMISOR O
MODULADOR EN LA RETINA DE POLLO”**

T E S I S

Que para obtener el titulo de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

DAVID MEZA GALVAN

San Juan Iztacala, México 1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



BIBLIOTECA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALMA

A mis padres y hermanos con cariño:

A mis amigos:

Quiero expresar mi más sincera gratitud a todas las personas, estudiantes e investigadores del C.I.FI.CE. que con sus actitudes y comentarios colaboraron, no sólo en la elaboración de este trabajo de tesis, sino en buena parte de mi formación personal, en especial a la Dra. Herminia Pasantes, por su estímulo y apoyo.

Asímismo quiero externar mi agradecimiento a Alicia, - Carlos, y Enrique por la confianza y apoyo que han depositado en mí.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Biól. Ismael Jiménez
Vocal: Med. Cir. Fernando Fernández Quiroz
Secretario: Biól. Sergio González Moreno
Suplente: M. en C. Héctor Barrera E.
Suplente: Med. Cir. Miguel Huerta

I N D I C E

	PAGINA
- Introducción -----	1
- Metodología -----	10
- Resultados -----	16
- Discusión -----	20
- Resumen -----	30
- Figuras y tablas -----	31
- Bibliografía -----	39

- Introducción : La retina es un modelo experimental que ofrece múltiples ventajas para el estudio de la función nerviosa y los mecanismos que regulan la visión, debido a que es una parte sumamente accesible del sistema nervioso central, que puede ser aislada del globo ocular, intacta, sin producirle daños considerables. Debido a su poco espesor es fácilmente perfundible y por ello constituye un material particularmente adecuado para estudios "in vitro" (1,2). Mediante el registro del electroretinograma sus condiciones funcionales pueden seguirse en experimentos "in vitro" (3).

La organización celular de la retina comprende 7 capas bien definidas a través de las cuales se distribuyen 5 tipos de neuronas y un tipo de células gliales (células de Muller) (4,5). Los somas neuronales constituyen las llamadas capas nucleares: La externa, formada por los fotorreceptores, y la interna, formada por los somas de las células amácrinas, horizontales y bipolares; los contactos sinápticos de estos tipos celulares se encuentran localizados en zonas discretas, la zona sináptica o plexiforme externa está formada por las sinapsis que se establecen entre las células bipolares, horizontales y las células fotorreceptoras, y la zona sináptica o plexiforme interna, en donde interactúan sinápticamente procesos de células bipolares, amácrinas y de células ganglionares (figura 1).

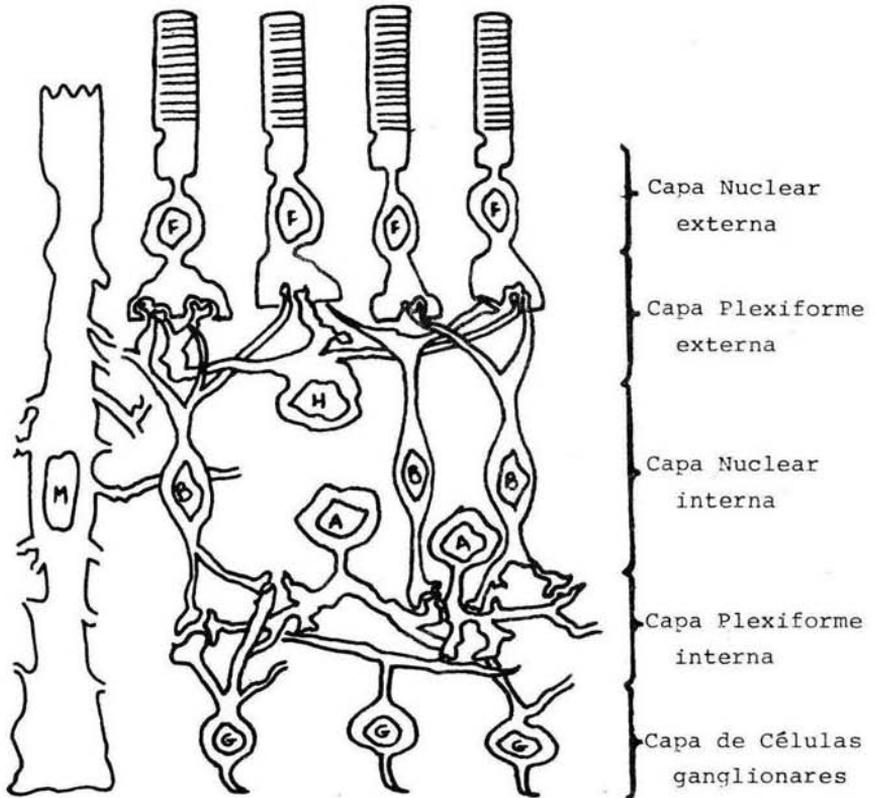


Figura 1. Esquema que muestra la disposición estratificada de los elementos celulares y sinápticos de la retina. A; Células amácrinas. B; Células bipolares. G; Células ganglionares. H; Células horizontales. F; Fotoreceptores. y M; Células de Muller. (Tomado de Dowling, J.E., (1970) (4).).

Es razonable suponer que desde un punto de vista - morfológico y funcional, así como por su desarrollo ontogénico, la retina utiliza las mismas substancias transmisoras que el resto del sistema nervioso central y puedeser utilizada como un modelo para el estudio de los mecanismos generales que rigen la transmisión sináptica en - el sistema nervioso (4).

La mayor parte de los transmisores químicos reconocidos en el sistema nervioso central parecen funcionar de la misma manera en las sinapsis de la retina. En la zona sináptica interna es en donde se han identificado hasta ahora la mayor parte de los neurotransmisores en la retina; el ácido gamma-aminobutírico y la glicina reconocidos neurotransmisores inhibidores en el sistema nervioso central parecen desempeñar esta misma función en las interneuronas inhibitoras de esta zona, modulando la transmisión entre las células bipolares y las ganglionares - (3). En la zona sináptica externa, donde se establecen - las sinapsis entre los fotorreceptores y las células bipolares que permiten la transmisión de la fotoexcitación - a través de las capas de la retina se ha considerado la existencia de sinapsis electrotónicas, sin embargo, el - gran número de vesículas presentes en las terminales de los fotorreceptores sugiere el funcionamiento de sinapsis mediadas químicamente (6).

En la retina las células fotorreceptoras y las células horizontales tienen bajos potenciales de membrana cuando la retina se encuentra adaptada a la obscuridad y responden a los estímulos luminosos hiperpolarizándose.

Se ha sugerido que hay una liberación continua de un neurotransmisor excitador de las terminales sinápticas de los fotorreceptores cuando la retina se encuentra adaptada a la obscuridad; esta liberación mantendría a las células horizontales y bipolares en un estado de depolarización constante. La identidad de este neurotransmisor excitador no ha sido aún definida.

Substancias como el ácido glutámico y el ácido aspártico, la acetilcolina y la sustancia "P", han sido propuestas como neurotransmisores en esta región de la retina, pero la evidencia experimental en favor de tal acción es aún limitada (3). En el presente estudio se realizaron experimentos tendientes a explorar la posible función del ácido glutámico como neurotransmisor a este nivel.

El ácido glutámico es un aminoácido dicarboxílico que tiene una multiplicidad de funciones en el metabolismo celular. En el sistema nervioso parece tener un efecto excitador muy generalizado habiéndose postulado como un neurotransmisor de naturaleza excitatoria, o bien como un modulador de la transmisión sináptica. De la misma manera que la acetilcolina, al aplicarse extracelularmente en concentraciones fisiológicas depolariza la membrana del axón probablemente debido a un incremento de la conductancia del sodio (7,8;9;10).

Existen algunos criterios básicos que determinan si una sustancia puede o no ser considerada como neurotransmisor:

1.- Debe estar presente en la terminal presináptica -
debiendo existir asimismo, un mecanismo de síntesis del -
neurotransmisor.

2.- El neurotransmisor debe ser liberado al espacio -
sináptico en respuesta a estimulación presináptica y me -
diante un mecanismo dependiente de calcio. El neurotrans -
misor ejerce su efecto sobre la postsinapsis a través de -
la unión específica del mismo con sitios receptores espe -
cíficos en la membrana postsináptica, modificando así su -
permeabilidad y permitiendo por consiguiente la transmisión
del impulso.

3.- Debe existir un mecanismo de eliminación del supuesto
neurotransmisor del espacio sináptico, que termine su -
acción fisiológica sobre la sinapsis.

4.- La administración exógena del neurotransmisor, de -
be producir los mismos efectos sobre la permeabilidad ión -
ica de la membrana, que los que produciría el supuesto -
neurotransmisor en condiciones fisiológicas liberado de -
la terminal presináptica (8,11,12).

El ácido glutámico esta presente en la retina en -
concentraciones relativamente altas constituyendo de un -
10 a un 15 % del total de aminoácidos libres (13). En -

cuanto a su distribución existe alguna controversia; así Kennedy et. al. (1977) (14), encontraron que el ácido glutámico se encuentra presente en mayor concentración principalmente en las regiones externas de la retina, mientras que Lowry et. al. (1956) (15), mostraron que el ácido glutámico en la retina de mono se encuentra relativamente en mayor concentración en la capa de células ganglionares.

El ácido glutámico se acumula en la retina mediante un proceso de alta afinidad, dependiente de sodio y sensible a la temperatura (3,16). Este sistema de transporte podría representar el mecanismo de inactivación, luego de realizarse su acción fisiológica.

Con el objeto de contribuir con mayor evidencia experimental, al conocimiento de la participación del ácido glutámico en la función de la retina y sobre la base de algunos de los criterios mencionados anteriormente para la identificación de un neurotransmisor, se llevaron a cabo los siguientes estudios:

1.- Localización de los sitios receptores del ácido glutámico en las diversas capas celulares de la retina.

a) Inyección intraocular de ácido ^3H -kaínico; la utilización de agentes químicos agonistas o antagonistas de la acción que ejerce el ácido glutámico sobre la post

sinapsis, cuya actividad química está bien caracterizada ha contribuido al conocimiento del neurotransmisor. Estas drogas pueden simular el efecto del neurotransmisor, potenciando su acción o bien inhibiéndola (17).

El ácido kaínico es un potente análogo de la acción-excitatoria del ácido glutámico en el sistema nervioso central. Su acción está mediada aparentemente por su interacción específica con los receptores postsinápticos del neurotransmisor (17,18,19,20). Inyectado intraocularmente, se analizó su distribución en las regiones externas e internas de la retina, mediante el uso de técnicas histoquímicas de microdissección.

b) Localización de los sitios receptores específicos de ácido glutámico sobre la postsinapsis mediante la medida de la unión específica del ácido ^3H -glutámico a membranas de terminales sinápticas aisladas y de fotoreceptores.

El procedimiento empleado se basa en la unión específica del ligando radiactivo y su posterior desplazamiento, según sea el caso, por el neurotransmisor no radiactivo o por agonistas o antagonistas de su efecto, de los sitios receptores de alta afinidad. El agente químico radiactivo se une a todos los posibles sitios receptores en la superficie de la membrana celular independiente de que su unión esté mediada por un mecanismo de alta o baja afinidad. Al adicionar el agente químico no marcado éste desplazará al marcado radiactivamente sólo-

en los sitios receptores en los que su unión este mediada por un mecanismo de alta afinidad, el cual se encuentra en función de la concentración utilizada del ligando radiactivo, de esta manera, la radiactividad desplazada por el compuesto no marcado será una determinación cuantitativa de la presencia de dichos sitios receptores (11, 12, 20, 21, 30).

2.- Captación y liberación "in vitro", del ácido glutámico en fracciones subcelulares aisladas de la retina de pollo.

El estudio de la captación del ácido glutámico por fracciones subcelulares enriquecidas en terminaciones sinápticas (sinaptosomas), provenientes en su mayoría de la región sináptica interna, o en fracciones que contienen las terminales de los fotorreceptores, puede indicar la localización de los sitios de captación de alta afinidad y por tanto la distribución de las sinapsis en las cuales el ácido glutámico puede actuar como neurotransmisor (3, 16).

La liberación del ácido glutámico en la retina completa así como en fracciones subcelulares en respuesta a condiciones experimentales que simulan la depolarización fisiológica puede contribuir asimismo, a la localización de sinapsis en las que el ácido glutámico se libera como neurotransmisor.

Para que estos resultados constituyan una evidencia en favor de la acción del ácido glutámico como neurotransmisor, es necesario demostrar que la liberación ocurre - en las terminales presinápticas, por esta razón, se analizó la liberación del ácido glutámico en fracciones subcelulares de retina de pollo en respuesta a concentraciones depolarizantes de cloruro de potasio, así como su captación en dichas fracciones.

- Metodología : 1.- Localización de los sitios receptores del ácido glutámico.

a) Inyección intraocular de ácido ^3H -kaínico: Se inyectó intravitrealmente, 20 μl . de la solución original en etanol-agua de ácido ^3H -kaínico (New England Nuclear, actividad específica = 7.3 Ci/mmol) (23), en ambos ojos de pollos jóvenes anestesiados, de 8 a 10 días de edad, mediante una microjeringa; al cabo de dos horas se aislaron por disección los globos oculares.

Obtención de las secciones: El ojo se congeló rápidamente en nitrógeno líquido, y se colocó la muestra sobre la platina de un criotomo de congelación (criotomo IEC) adhiriéndose a ella mediante un agente embebedor-fijador (Tissue-tek) (15,24,25). El ojo adherido a la platina permaneció en la cámara del criotomo durante una hora, donde se le permite estabilizar su temperatura con la del criotomo. La temperatura óptima de corte varía, pero usualmente se encuentra en un rango que va de -20 a -25°C.

Los cortes se realizaron en dirección tangencial al globo ocular. Para evitar que las secciones de 8 a 10 μm , de espesor, se enrollen al desprenderse de la cuchilla se utilizó una placa de plexiglass colocada sobre la cuchilla del criotomo (26). Las secciones se separaron una

de otra y se trasladaron siguiendo el orden de obtención de las muestras, mediante un manipulador a portaobjetos-
de vidrio.

Los portaobjetos conteniendo los cortes seriados se mantuvieron a la misma temperatura de corte hasta el momento de la liofilización. Las secciones deben ser liofilizadas en frío, a una temperatura de -35°C , con el fin de obtener un secado uniforme de las secciones (15, 25).

Microdissección : Las poblaciones celulares y sinápticas de la retina aparecen en los cortes tangenciales como anillos concéntricos; debido a la seriación de los cortes, las capas de la retina aparecen una a una en el centro del corte, libres de contaminación por otras capas y pueden ser aisladas de las secciones, mediante un bisturí fino y con la ayuda de un microscopio de disección (26).

El material obtenido por microdissección se resuspendió y homogenizó con ácido perclórico 0.1 N, el homogenizado se centrifugó en una microfuga Beckman 125, un minuto.

La radiactividad acumulada por el tejido se determinó en el sobrenadante mediante la adición de líquido de centelleo para muestras acuosas (Tritosol).

La cantidad de material utilizado se determinó en el sedimento por medio del micrométodo de Lowry modificado para determinación de proteínas en muestras pequeñas (27).

Los resultados se expresan en desintegraciones por -

minuto por miligramo de proteína.

La radiactividad incorporada en la retina de cada ojo seccionado se determinó digiriendo el tejido con NCS (so lubilizador de tejidos), y mediante la adición de líquido de centelleo (Tritosol).

B) Interacción del ácido glutámico con membranas - aisladas de la retina completa y de fracciones subcelulares P1 y P2 de la retina de pollo: Las fracciones subcelulares P1 (nuclear cruda), y P2 (sinaptosomal cruda), - se aislaron de homogenados de retina de pollo en sacarosa 0.3 M (MgSO_4 1×10^{-4} M), mediante centrifugación diferencial en sacarosa isotónica 0.32 M siguiendo el método de Whitaker para separación de fracciones primarias - en el cerebro (13,22).

La fracción P1 o nuclear cruda contiene fragmentos de los fotoreceptores, segmentos internos, segmentos externos y sus terminales sinápticas. La fracción P2 o sinaptosomal cruda contiene principalmente terminaciones sinápticas convencionales procedentes de la capa plexiforme - interna, así como algunas mitocondrias.

Para la obtención de las membranas, las fracciones subcelulares P1 y P2 de la retina se sometieron a un choque hipotónico con agua bidestilada (relación P/V = 1:20) a una temperatura de 4.0 °C, seguido de centrifugación - a 45,000 X g durante 20 minutos. El sedimento resultan-

te de la centrifugación se resuspendió en medio Krebs - tris-HCl (NaCl 118.0 mM; KCl 4.7 mM; K_2HPO_4 1.2 mM; $CaCl_2$ 2.5 mM; $MgSO_4$ 1.17 mM; amortiguador tris-HCl a pH 7.4, y 0.1M).

Se emplearon dos protocolos experimentales con la finalidad de discernir entre la interacción específica del aminoácido con sitios de captación, y su interacción específica con sitios receptores postsinápticos.

En el primero de ellos se utilizaron membranas recién obtenidas, en presencia de sodio 118.0 mM en el medio de incubación para determinar su unión con sitios de captación; en otro se utilizaron preparaciones de membranas congeladas a 0 °C en ausencia de sodio en el medio de incubación, para determinar si la unión específica del aminoácido resulta de su interacción con sitios receptores postsinápticos, cuyo mecanismo ha demostrado ser independiente de sodio (30). En este último caso las membranas obtenidas de las fracciones P1 y P2 se incubaron en medio Krebs tris-HCl, con tritón X-100 (concentración final 0.5 %), durante 30 minutos, a 37 °C, antes de realizar la determinación con el objeto de evitar la posibilidad de un mecanismo de transporte al interior de vesículas reselladas de membranas.

Alícuotas de cada fracción se incubaron en frío durante 5 minutos con una mezcla de ácido L- 3H -glutámico - (N.E.N., actividad específica 46.15 Ci/mmol, 20 nM) como ligando al sitio de unión, y ácido glutámico frío 1.0

mM, como desplazador. La reacción se detuvo centrifugando la mezcla de incubación a 45,000 X g, durante 20 minutos, a una temperatura de 4 °C. El sedimento resultante de la centrifugación se lavó superficialmente con agua bidestilada, la radiactividad se determinó después de la adición de líquido de centelleo (Tritosol).

La unión específica del aminoácido al sitio receptor se determinó restando de la radiactividad total unida a las preparaciones de membranas (control), la radiactividad remanente en las preparaciones en presencia del agente desplazador (la cual se considera unida inespecíficamente) (28,29,30).

2. Captación y liberación "in vitro", de ácido glutámico en fracciones P1 y P2 de la retina de pollo.

a) Captación de ácido ³H-glutámico: Las fracciones P1 y P2 de la retina, se resuspendieron en medio Krebs tris-HCL. Cada fracción se incubó en presencia de ácido 1-³H-glutámico (N.E.N., actividad específica 46.15 Ci/mmol, 10.0 mCi/ml.) o de ácido ³H-kaínico (N.E.N., actividad específica 7.3 Ci/mmol, 10.0 mCi/ml.), durante 5 minutos y a una temperatura de 37 °C, con agitación. Después de la incubación se tomó una alícuota de cada fracción conteniendo de 0.4 a 1.0 mg. de proteína y se centrifugó en una microfuga Beckman 125, un minuto.

La radiactividad incorporada en las fracciones se determinó en el sedimento previa solubilización con NCS, y mediante la adición de líquido de centelleo (trititol).

b) Liberación de ácido ^{14}C -glutámico en presencia de concentraciones depolarizantes de KCl: Las fracciones P1 y P2 en las que previamente se incorporó el ácido ^{14}C glutámico (actividad específica 48.75 mCi/mmol), en un medio Krebs-bicarbonato (NaCl 118.0 mM; K_2HPO_4 1.2 mM; KCl 4.7 mM; CaCl_2 2.5 mM; MgSO_4 1.17 mM; NaHCO_3 25.0 mM; glucosa 5.6 mM), se filtraron a través de un filtro Millipore de 0.45 μm . de poro. Fragmentos de este filtro al cual quedan adheridas las fracciones subcelulares, se colocaron en una cámara de perfusión de vidrio (capacidad de 0.25 ml.) y se perfundieron a un flujo constante de 0.6 ml/min., con medio Krebs-bicarbonato oxigenado y a una temperatura de 37 °C, colectando el líquido de perfusión cada minuto. La estimulación se llevó a cabo mediante el cambio del medio original, por medio conteniendo cloruro de potasio 48.0 mM como agente depolarizante.

La radiactividad del compuesto liberado por estimulación se midió después de agregar líquido de centelleo en cada uno de los perfusados recolectados cada minuto.

- Resultados : 1.- Captación y liberación de ácido glutámico por fracciones subcelulares de la retina de pollo.

a) Captación: Las fracciones subcelulares P1 y P2 - aisladas de la retina de pollo, fueron incubadas en un medio Krebs-bicarbonato, a 37 °C. La captación de ácido-³H-glutámico por la fracción P2 fué un poco mayor que la observada en la fracción P1 (figura 2).

b) Liberación: La liberación del ácido ¹⁴C-glutámico previamente incorporado por la retina completa o por las fracciones subcelulares de la retina se midió en un sistema de superfusión. La liberación de radiactividad en la retina completa correspondió aproximadamente a una fracción de 2.5 % por minuto del total de radiactividad incorporada. La superfusión de la retina con un medio - conteniendo concentraciones depolarizantes de KCl (48.0-mM), no afectó el patrón de liberación del ácido ¹⁴C-glutámico (35).

La figura 3, muestra el efecto de concentraciones depolarizantes de KCl sobre la liberación de ácido ¹⁴C-glutámico previamente incorporado a las fracciones subcelulares de la retina P1 y P2. La depolarización producida por el potasio indujo un incremento significativo en la liberación del ácido ¹⁴C-glutámico de la fracción-

nuclear cruda (P1). El aumento observado fué aproximadamente de un 38 % sobre el nivel de liberación previo a la estimulación. En la fracción sinaptosomal cruda (P2), la superfusión con un medio conteniendo concentraciones depolarizantes de KCl, no modificó la liberación espontánea del ácido ^{14}C -glutámico.

2.- Localización de los sitios receptores de ácido glutámico, en las diversas capas celulares de la retina de pollo.

a) Inyección intraocular de ácido ^3H -kaínico: La distribución del ácido kaínico radiactivo inyectado intraocularmente, en las diversas capas celulares de la retina, muestra que existe una mayor interacción del ácido kaínico con los elementos celulares que constituyen las capas externas de la retina, aproximadamente un 60 % del total del ácido ^3H -kaínico incorporado se encontró en las secciones que contienen los elementos celulares de la zona de los fotoreceptores; un 40 % de la radiactividad total incorporada se encontró en las secciones correspondientes a las capas celulares y sinápticas internas de la retina (nuclear y sináptica internas) y células ganglionares (figura 4).

b) Interacción del ácido glutámico con membranas aisladas de la retina completa y de fracciones subcelulares - P1 y P2 de la retina de pollo: La unión específica de ácido

³H-glutámico en las membranas obtenidas de la retina completa fué considerable, tanto en las membranas frescas - en presencia de sodio, como en las membranas sometidas - a congelación a 4 °C en ausencia de sodio. Un tratamiento con tritón X-100 en estas últimas condiciones aumentó considerablemente la unión específica del aminoácido (tabla 1).

En las membranas obtenidas de fracciones subcelulares de la retina, recién preparadas, la unión específica del ácido glutámico medida en presencia de sodio fué de 38.1 dpm X 10⁻³ X mg.⁻¹ en la fracción P1 y de 27.8 dpm X 10⁻³ X mg.⁻¹ en la fracción P2. En ambos casos, pero - particularmente en la fracción P2, el tratamiento con tritón X-100 aumentó la unión específica del aminoácido.

Medida en membranas congeladas y en ausencia de sodio, - la unión específica del ácido glutámico fué de 19.2 y - 9.2 dpm X 10⁻³ X mg.⁻¹ en las fracciones P1 y P2 respectivamente. El tratamiento con tritón X-100 aumentó dicha interacción a 21.1 dpm X 10⁻³ X mg.⁻¹ en las membranas aisladas de la fracción P1 y a 12.0 dpm X 10⁻³ X mg.⁻¹ en aquellas obtenidas de la fracción P2 (tabla 2).

La unión específica del ácido glutámico medida utilizando ácido kaínico como agente desplazador en sustitución del ácido glutámico no radiactivo, no se vió afectada en ninguna de las condiciones experimentales utilizadas en el caso de la fracción P2. En la fracción P1 el -

ácido kaínico desplazó la unión de ácido glutámico aproximadamente un 30 % respecto al desplazamiento con ácido glutámico 1.0 mM, en membranas frescas, en presencia de sodio (tabla 3).

La unión específica de ácido kaínico, corresponde a un 10 % de los valores obtenidos en la unión específica de ácido glutámico. El ácido kaínico se une específicamente a las membranas de las fracciones P1 y P2 en todas las condiciones experimentales probadas, siendo un poco mayor en las membranas obtenidas de la fracción P1.

La unión específica de ácido kaínico es totalmente desplazada por ácido glutámico 1.0 mM (tabla 4).

La unión específica del ácido glutámico medida a concentraciones crecientes de ácido glutámico no radiactivo se examinó en un rango entre 1.0×10^{-9} mM y 2.0×10^{-6} mM. En ambas fracciones se observó una cinética de saturación (figura 5).

- **Discusión:** La característica primordial que define la acción de un compuesto neuroactivo como transmisor o como modulador, es el grado de especificidad de sus acciones y la restricciones de las mismas a sinapsis determinada. La capacidad de un compuesto de modificar las propiedades de la membrana neuronal en cuanto se refiere a cambios en la permeabilidad y sus consiguientes modificaciones del potencial no bastan por sí mismas para clasificarlo como un transmisor sináptico aún cuando en algunos casos es un indicio extremadamente útil en la búsqueda de nuevos transmisores (8). Sin embargo, un compuesto puede ejercer una acción neuronal inespecífica mediada por mecanismos generales, o bien mediante el uso de receptores que no son fisiológicamente los suyos pero que tienen cierta similitud estructural con el neurotransmisor natural lo que le permite utilizar y así mimetizar el efecto del transmisor (9).

Los estudios de localización del compuesto neuroactivo con herramientas bioquímicas, en algunos casos no son suficientes tampoco para discernir entre una acción de neurotransmisor o neuromodulador. Esto es particularmente cierto en el caso de compuestos con acción a nivel neuronal que participan en mecanismos y

reacciones metabólicas no necesariamente asociadas a su actividad puramente neuronal (10). El caso de los aminoácidos es particularmente demostrativo de este punto, es especial por ejemplo el de los aminoácidos; aspártico, glutámico y glicina. Estas sustancias están involucradas en mecanismos tan generales como la síntesis de proteínas y la participación en reacciones cruciales del metabolismo intermedio.

En estas condiciones su evidente ubicuidad hace imposible obtener información sobre los sitios precisos en los cuales puedan estar ejerciendo una acción específica como neurotransmisores y menos aún establecer la posibilidad de diferenciar entre una posible acción como neurotransmisor o como neuromodulador.

Los criterios clásicos utilizados en la definición de un compuesto como neurotransmisor tales como la liberación del candidato en respuesta a estímulos depolarizantes y la presencia de un mecanismo de eliminación del compuesto activo de la sinapsis una vez concluida su acción en la misma, no permiten tampoco discernir entre una acción definida, restringida a sinapsis específicas que corresponderían a una función de transmisor sináptico o a una acción más generalizada que le ubicaría en el marco de una acción como neuromodulador. Esto se debe a que con las técnicas de las que hasta ahora se dispone -

es prácticamente imposible aislar poblaciones definidas e identificables determinaciones sinápticas. Por esta razón la existencia de áreas del sistema nervioso en las que existe una estratificación definida de estructuras constituyen modelos experimentales extremadamente útiles para abordar este tipo de problemas. La retina es una de estas regiones en las cuales las sinapsis excitadoras e inhibitoras se encuentran si no claramente separadas sí suficientemente concentradas en áreas definidas (4).

Por otra parte las terminaciones sinápticas aisladas de las especies celulares fundamentalmente excitadoras o inhibitoras se distribuyen por su tamaño y pueden por esta propiedad ser separadas utilizando las técnicas comunes de centrifugación diferencial.

Se sabe que el transmisor liberado por los fotoreceptores es un excitador (33); En los vertebrados los fotoreceptores están continuamente depolarizados en la oscuridad y se hiperpolarizan al momento de la iluminación; ésto sugiere la liberación continua en la oscuridad de un transmisor excitador de las terminales del receptor que cesaría al ser iluminadas las células (31). Los mecanismos iónicos que se sabe ocurren durante la iluminación proporcionan una evidencia experimental para esta interpretación. La membrana del segmento externo del fotoreceptor es libremente permeable al sodio mientras que la del segmento interno lo es al potasio (32). En la obscuri

ridad se sabe que existe una continua corriente de sodio - en el segmento externo del fotoreceptor de afuera hacia adentro; este sodio sale de nuevo al exterior por medio de - la acción de una bomba que se ha identificado con una - ATPasa Na-K dependiente, la cual mediante la estimulación- de flujos correspondientes de potasio en el sentido opues- to -de afuera hacia adentro-, que ocurrirían sobre todo en el segmento interno del fotoreceptor, mantendría los nive- les constantes de sodio (32). Durante la iluminación la- corriente de sodio que ocurre en la obscuridad y la subsi- guiente salida de sodio-entrada de potasio, cesarían brus- camente, y el potasio de la zona interna del fotoreceptor- siendo libremente permeable saldría del mismo; la consi - guiente disminución en los niveles de potasio traería como consecuencia un cese en la liberación del neurotransmisor de la terminal del fotoreceptor.

La naturaleza del transmisor liberado por las termina- les presinápticas de los fotoreceptores no se ha determina- do y los candidatos obvios para desempeñar este papel son- los neurotransmisores excitadores conocidos en el sistema- nervioso central, es decir, los aminoácidos glutámico y as- pártico, la acetilcolina y probablemente algunos péptidos- excitadores como la substancia "P" (33, 34). Los resulta- dos del presente trabajo podrían considerarse como un apo- yo a una posible acción del ácido glutámico como neuro -

transmisor en la zona de los fotorreceptores por las siguientes razones: Las terminaciones sinápticas aisladas de la retina incorporan el ácido glutámico en condiciones que reflejan la presencia de un mecanismo de alta a finidad dependiente de sodio y saturable a bajas con centraciones externas del aminoácido. Se sabe que con la - excepción de la acetilcolina para la cual existe un mecanismo de inactivación enzimática (33), en la mayor- parte de los neurotransmisores conocidos hasta ahora la inactivación a nivel de la sinápsis se lleva a cabo por un sistema de captación altamente eficiente que lo lle- varía de la hendidura sináptica transfiriéndolo a la - postsinápsis o de nuevo a la terminal presináptica pero en cualquier caso removiéndolo de los receptores sensi- bles a su acción. La identificación de este proceso en- el caso del ácido glutámico en la retina favorecería su posible función como neurotransmisor, pero sin embargo, no excluye la posibilidad de que actuara como un modula- dor para el cual se requeriría igualmente un mecanismo- de eliminación de los sitios en los que ejerciera su ac ción fisiológica. La diferencia estaría dada por la res tricción de los sitios de captación a sinápsis especifi cas en el caso de una acción como neurotransmisor o a - una distribución más generalizada si la función fuera - la de un modulador. En el caso del ácido glutámico la -

captación así como la presencia de sitios de unión correspondientes a sitios de transporte en la membrana - se distribuyeron de manera prácticamente uniforme en - las diferentes poblaciones sinaptosomales obtenidas. - Más aún, se observó una mayor concentración de este - proceso en las terminaciones sinápticas aisladas del - tipo convencional, es decir, de aquéllas que proceden - de las células horizontales, de las interneuronas amá - crinas y de las células bipolares; no se observó una - localización preferente en la sinápsis procedentes de - los fotoreceptores. Esto no excluye, por supuesto, la - posibilidad de que el ácido glutámico pueda ser consi - derado el neurotransmisor liberado por los fotorecepto - res, en forma activa en mecanismos sinápticos en una - gran población de terminaciones nerviosas de la retina.

El ácido glutámico previamente incorporado a la - retina completa se retiene proporcionalmente menos que - otros aminoácidos considerados como posibles neuro - transmisores, tales como la glicina o el GABA. Des - pués de diez minutos de perfusión, en el caso del áci - do glutámico, se ha liberado el 25 % del total incor - porado; esta cifra es considerablemente menor en el - caso de la glicina (10 %) o el GABA (12 %) (35). - Se ha considerado que la retención de los aminoácidos

por el tejido nervioso es una característica que distingue a los aminoácidos neuroactivos, posibles neurotransmisores, de los aminoácidos no involucrados en mecanismos sinápticos. El ácido glutámico no se liberó de la retina completa en respuesta a concentraciones depolarizantes de KCl. Sin embargo, al estudiar el efecto de este estímulo en fracciones subcelulares de la retina se observó que la liberación del ácido glutámico se incrementó significativamente, aunque no en gran proporción, en la fracción subcelular que contiene a las terminaciones nerviosas de los fotot receptores. Si se considera que dentro del total de terminaciones sinápticas sólo unas pocas utilizaron al ácido glutámico como neurotransmisor esto explicaría la ausencia de respuesta en la retina completa.

Por lo que se refiere a los resultados de la medida de la interacción del ácido glutámico con las membranas de la retina, puede concluirse que el tipo de interacción que presenta el ácido glutámico con las retinas totales corresponde por sus características, a la unión con el receptor postsináptico (11). En este estudio se pudo detectar asimismo el tipo de interacción que corresponde a la unión con el sitio de la membrana que transporta el aminoácido. Esta unión es dependiente de sodio y de temperatura y es sensible a la acción de los inhibidores del transporte del aminoácido.

Sin embargo, los resultados utilizando al ácido glutá

mico y al ácido kaínico como desplazadores, indican - que si bien el primero desplaza en todos los casos al - ligando radiactivo, esto no es así para el ácido kaínico quien no es capaz de desplazar con la misma eficiencia que el ácido glutámico no radiactivo al ácido glutámico tritiado. En cambio, la unión del ácido kaínico radiactivo fué totalmente desplazada por el ácido glutámico.

Estos resultados sugieren que la unión de ácido glutámico, insensible a sodio e independiente de la temperatura, ocurre en dos sitios distintos, en uno de los cuales el ácido kaínico es un desplazador eficiente y - en el otro no. La concentración de los sitios de unión - del ácido glutámico que pueden ser desplazados por el ácido kaínico es sin embargo muy baja. La distribución subcelular de los sitios de unión del ácido glutámico mostró una distribución preferente en las membranas obtenidas de la fracción P1, es decir, en la que se separan las terminaciones nerviosas de los fotoreceptores. Así mismo, los sitios de unión del ácido ^3H -glutámico desplazado por el ácido kaínico sólo se detectaron en membranas de la fracción P1. Asimismo, los sitios de unión del ácido ^3H -kaínico, desplazados tanto por el ácido kaínico no radiactivo como por el ácido glutámico, se localizaron preferentemente en la fracción P1. Debe hacerse notar -

que cuantitativamente este tipo de interacción es mucho menos importante que la del ácido ^3H -glutámico.

Los resultados de esta parte del trabajo parecen indicar que las interacciones del ácido glutámico del tipo que se considera asociado al receptor postsináptico fueron mas numerosas en todos los casos en las membranas - obtenidas de la fracción subcelular enriquecida en terminaciones sinápticas aisladas de los fotoreceptores. Hay que hacer notar, sin embargo, que las uniones de este tipo no están restringidas a estas terminaciones sino que también se encontrarían en las membranas procedentes de sinaptosomas convencionales.

Los resultados del presente estudio pueden considerarse como evidencia preliminar en apoyo de una acción - del ácido glutámico como neurotransmisor en los fotoreceptores. Estas observaciones constituyen únicamente un esfuerzo inicial que deberá ser fundamentado con estudios más - detallados sobre la especificidad de los fenómenos estudiados para el ácido glutámico. Es necesario recordar que el ácido aspártico es un análogo estructural del ácido glutámico, en sistemas de transporte, así como de su acción excitatoria en las neuronas.

Las observaciones realizadas en este trabajo sugieren que la acción del ácido glutámico puede no estar res -

tringida a la de un neurotransmisor. La presencia de un - eficaz sistema de transporte, distribuido en forma prácti camente uniforme en todas las poblaciones de terminales - sinápticas aisladas, hace pensar en su implicación en un mecanismo general en el funcionamiento de la sinapsis.

- Resumen : En la retina el ácido glutámico ha sido propuesto como un aminoácido neurotransmisor de naturaleza excitatoria, en la región externa de la retina, donde se establecén las sinapsis entre los fotoreceptores y los procesos dendríticos de las células bipolares. La evidencia experimental que apoye la participación del ácido-glutámico como neurotransmisor en la retina es aún limitada. En el presente estudio se analizó la posible acción - del ácido glutámico como neurotransmisor en la retina sobre la base de algunos de los criterios utilizados en la identificación de un compuesto como transmisor sináptico- mediante la utilización de herramientas bioquímicas e histoquímicas. Se analizó la liberación, la captación y la - localización de sitios receptores del ácido glutámico en la retina, en fracciones subcelulares P1 (nuclear cruda)- y P2 (sinaptosomal cruda) aisladas de la retina de pollo, así como en la retina completa.

Los resultados del presente estudio pueden considerarse como una evidencia a favor de la acción del ácido glutámico como neurotransmisor en la retina, sin embargo, la presencia de un sistema de captación de alta afinidad de ácido glutámico en la mayor parte de las capas celulares- de la retina sugiere una participación más general en los mecanismos sinápticos de este órgano.

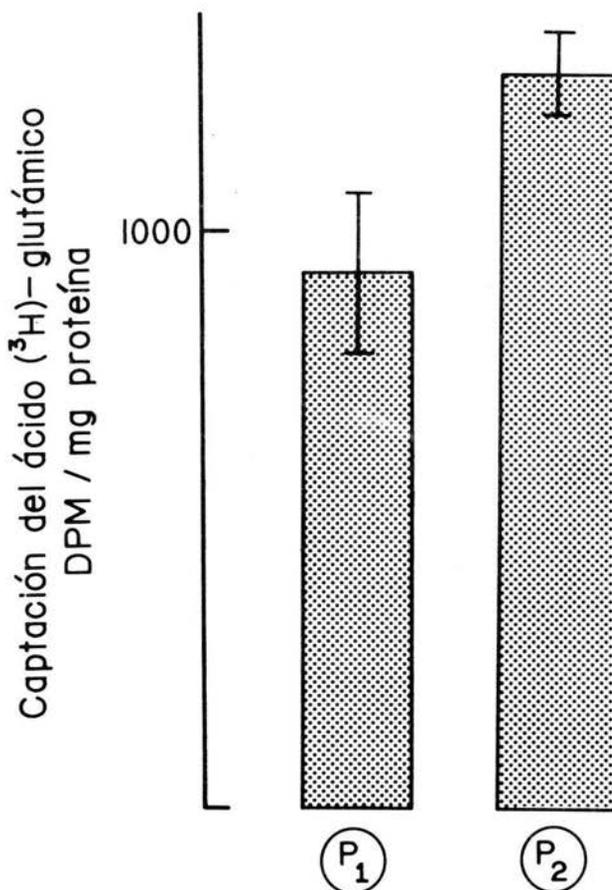


FIGURA 2 Captación de ácido ³H-glutámico, en las fracciones P1 y P2 de la retina de pollo.- Las fracciones subcelulares P1 (nuclear cruda) y P2 (sinaptosomal cruda), fueron obtenidas por centrifugación diferencial en sacarosa isotónica 0.32 M, a partir de homogenados de retina de pollo y de acuerdo al método de Whitaker para separación de fracciones primarias en el cerebro. En la figura puede apreciarse la captación realizada por dichas fracciones en un medio Krebs-tris-HCl conteniendo ácido glutámico radiactivo. Los experimentos fueron realizados a temperaturas de 0 °C y 37 °C, los resultados están expresados en desintegraciones por minuto por miligramo de proteína y constituyen la media de 5 experimentos por separado, mas menos el error estándar de la media.

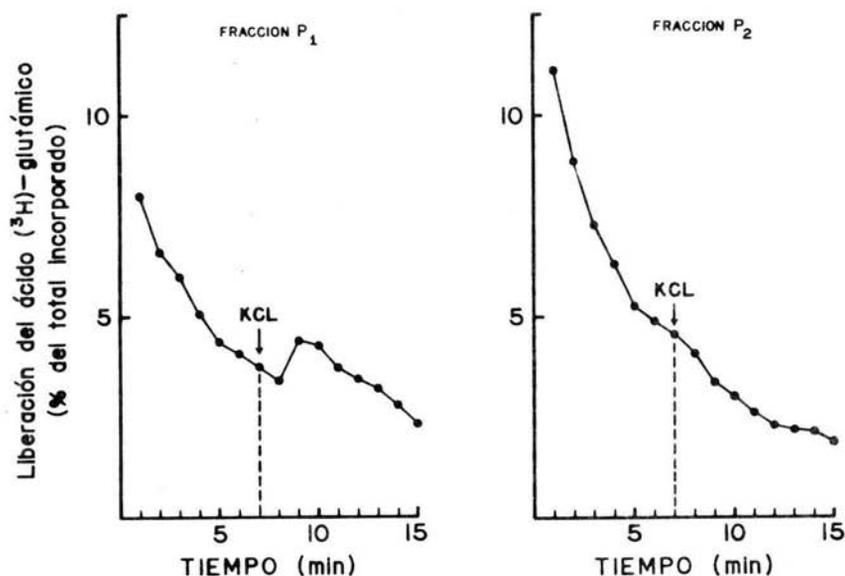


FIGURA 3 Liberación de ácido (¹⁴C)-glutámico, por las fracciones P₁ y P₂ de la retina de pollo.- La fracción P₁ (nuclear cruda) contiene además de los núcleos celulares, fragmentos de células fotorreceptoras, tales como segmentos externo, separados y resellados, segmentos internos y terminaciones nerviosas aisladas provenientes también de los fotorreceptores. La fracción P₂ (sinaptosomal cruda) contiene principalmente terminaciones sinápticas convencionales, aisladas y reselladas y algunas mitocondrias.

La liberación del ácido glutámico, por las fracciones P₁ y P₂ de la retina se realizó en un medio Krebs-bicarbonato conteniendo 48.0 mM de cloruro de potasio como agente depolarizante. En la figura las flechas indican el momento en el que fué aplicado el estímulo. Los resultados se expresan como el porcentaje del total incorporado por cada fracción.

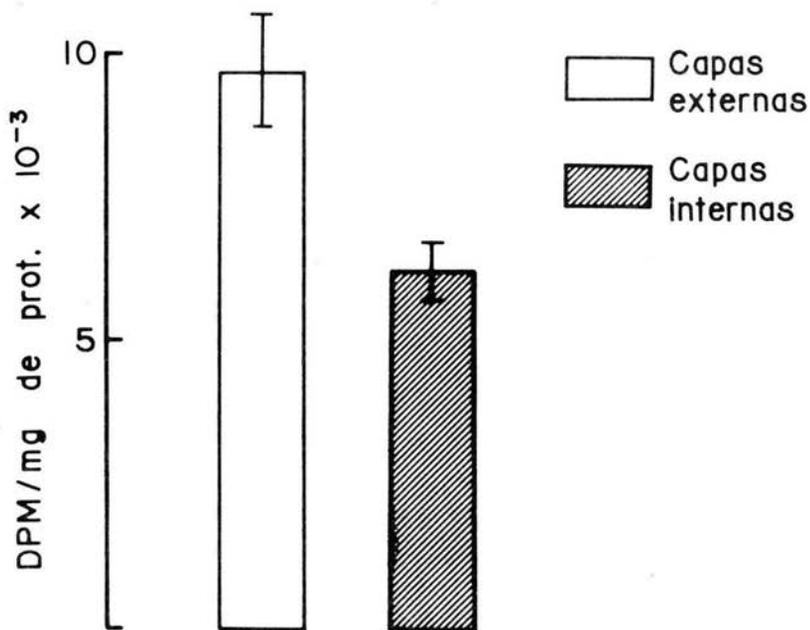


FIGURA 4 Distribución del ácido ³H-Kaínico a través de las capas celulares de la retina.- Las capas externas de la retina corresponden a la capa de células fotorreceptoras, y a las capas nuclear y plexiforme externas; las capas internas corresponden a las capas nuclear y plexiforme interna y la capa de células ganglionares en la retina.

Las capas fueron obtenidas por microdissección de cortes histológicos finos de la retina (de 6 a 8 μ m.), realizados tangencialmente al globo ocular, al que previamente se inyectó ácido ³H-kaínico por vía intravítreal.

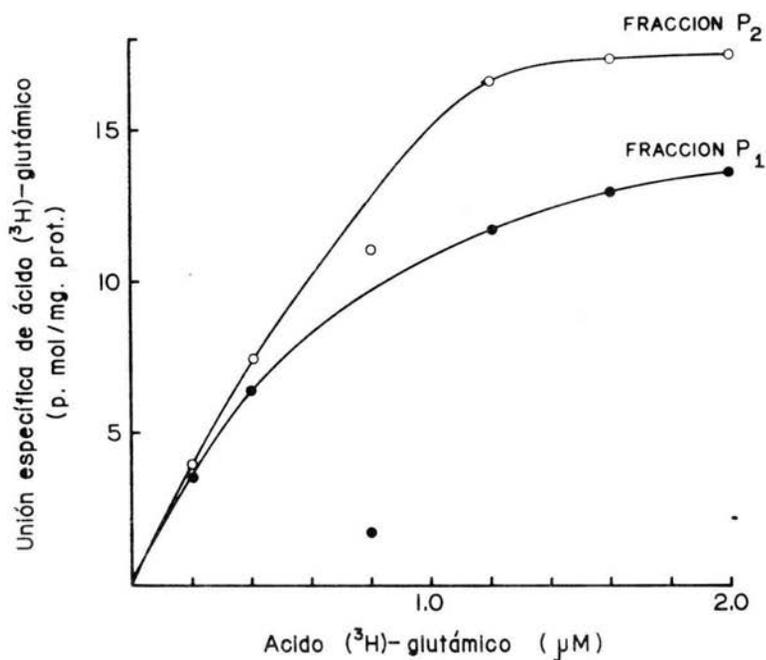


FIGURA 5 Curva de saturación de la unión específica de ácido ³H-glutámico en fracciones P₁ y P₂ de la retina.- La unión específica de ácido glutámico se determinó a concentraciones crecientes de ácido glutámico no radiactivo en un rango que va de 1.0×10^{-9} mM a 2.0×10^{-6} mM, pudiendo apreciarse una cinética de saturación para ambas fracciones. Los resultados se encuentran expresados en picomolas $\times 10^{-3}$ por miligramo de proteína.

Tabla 1. Unión específica de ácido $^3\text{(H)}$ -glutámico a las membranas obtenidas de la retina completa, utilizando ácido glutámico 1.0 mM como desplazador.

	Unión específica (pmol/mg de proteína)
- Membranas frescas con sodio.	2.50
- Membranas congs. sin sodio.	0.50
- Membranas congs. sin sodio, más tri- tón X-100.	1.85

Los resultados, expresados en picomoles por miligramo de proteína, representan la resta de la radiactividad incorporada por las membranas en presencia del aminoácido radiactivo, menos la radiactividad incorporada por las membranas en presencia del agente desplazador.

Tabla 2. Unión específica de ácido ^3H -glutámico a las membranas obtenidas de las fracciones subcelulares P1 y P2 de la retina, utilizando ácido glutámico 1.0 mM como-desplazador.

	Unión específica (pmol/mg de proteína)	
	Fracción P1	Fracción P2
- Membranas frescas con sodio.	0.35	0.27
- Membranas frescas con sodio, más tri- tón X-100.	0.45	0.45
- Membranas congs. sin sodio.	0.17	0.12
- Membranas congs. sin sodio, más tri- tón X-100.	0.27	0.16

El procedimiento para la obtención de las membranas a partir de las fracciones subcelulares se describe en la metodología, alícuotas de cada fracción se incubaron en medio Krebs-tris-HCl conteniendo ácido ^3H -glutámico como-ligando al sitio de unión, y ácido glutámico no radiactivo como desplazador. Estos resultados se expresan en pico moles por miligramo de proteína y representan la media aritmética de cuando menos tres determinaciones por separado.

Tabla 3. Unión específica de ácido ^3H -glutámico a -
membranas obtenidas de fracciones subcelulares de la re-
tina, utilizando ácido kaínico 1.0 mM como desplazador.

	Unión específica (pmol/mg de proteína)	
	Fracción P1	Fracción P2
- Membranas frescas con sodio.	0.11	0.04
- Membranas frescas con sodio, más tri- tón X-100.	0.00	0.00
- Membranas congs. sin sodio.	0.00	0.00
- Membranas congs. sin sodio, más tri- tón X-100.	0.00	0.00

Los resultados se encuentran expresados en picomolas-
por miligramo de proteína y constituyen la media aritmé-
tica de cuando menos tres determinaciones por separado.

Tabla 4. Unión específica de ácido ^3H -kaínico a las membranas obtenidas de fracciones subcelulares de la retina, utilizando ácido kaínico y ácido glutámico 1.0 mM como desplazadores.

Unión específica (pmol/mg de proteína)		
Ac. Kaínico	Fracción P1	Fracción P2
- Membranas congs. sin sodio.	0.017	0.011
Ac. Glutámico	Fracción P1	Fracción P2
- Membranas congs. sin sodio.	0.019	0.010

Los resultados se encuentran expresados en picomoles - por miligramo de proteína y constituyen la media aritmética de cuando menos tres determinaciones por separado.

- Bibliografia :

- 1.- Davson, H. (1960). Physiology of the ocular and cerebro-spinal fluids; London J. & A. Churchill. pp. 75-86.
- 2.- Polyak, S.L., (1961). The retina (the anatomy and the Histology of the retina in man, ape, and monkey, including the consideration of visual functions, and the histological laboratory technique); Univ. Press. E.U.A.
- 3.- Neal, M.J., (1976). Aminoacid transmitter substances in the vertebrate retina. Gen. Pharmacol., 7, 321-332.
- 4.- Dowling, J.E., (1970). Organization of vertebrate retinas. Invest. Ophthalmol., 9, 655-680.
- 5.- Straatsma, R.B., et. al., (1969). The retina (morphology, function, and clinical characteristics); Univ. of Calif. Press. E.U.A., pp. 18-20, 75.
- 6.- Sarthy, P.V., & Lam, D.M.K., (1979). Endogenous levels of neurotransmitter candidates in photoreceptor cells of turtle retina. J. of Neurochem., 32, 455-461.
- 7.- Johnson, J.L., (1972). Glutamic acid as a synaptic transmitter in the nervous system. Brain Res., 37, 1-19.
- 8.- Dunn, A.J., et. al., (1974). Functional chemistry of the brain; John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 113-146.
- 9.- Curtis, D.R., & Johnston, G.A.R., (1974). Aminoacid transmitters in the mammalian central nervous system. Rev. Physiol. Biochem. Exp. Pharmacol., 69, 98-188.

- 10.- Kuhar, M.J., et. al., (1978). Distribution of some suspected neurotransmitters in the central nervous system. Reviews of Neuroscience, Raven Press, New York., 3, 35-76.
- 11.- Yamamura, H.I., et. al., (1978). Neurotransmitter receptor binding.; Raven Press, New York., 41-53.
- 12.- Cooper, J.R. et. al., (1970). The biochemical basis of neuropharmacology.; Oxford Univ. Press. New York, 14-57.
- 13.- Pasantes-Morales, H., Kleithi, J., Ledig, M., & Mandel, P. (1972a). Free aminoacids of chicken and rat retina. - Brain Res., 41, 494-497.
- 14.- Kennedy, A.J., et. al., (1977). The distribution of aminoacids whitin the rat retina. J. of Neurochem. 29, 157-159.
- 15.- Lowry, O.H., Roberts, N.R., Lewis, C., (1956). The quantitative histochemistry of the retina. J. Biol. Chem. 220, 879-892.
- 16.- Iversen, L.L., & Neal, M.J., (1968). The uptake of ³H-GABA by slices of rat cerebral cortex. J. Of Neurochem. 15, 1141-1149.
- 17.- Olney, J.W., Rhee, V., & Ho, O.L., (1974). Kainic Acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. Brain Res. 77, 507-512.
- 18.- Hall, J.G., Hicks, T.P., & McLennan, H., (1978). Kainic acid and the glutamate receptor. Neurosci., 8, 171-175.
- 19.- Schwarcz, R., Scholz, D., & Coyle, J.T., (1978). Struc-

- ture-activity relations for the neurotoxicity of kainic acid and glutamate analogues. N-europharm., 17, 145-151.
- 20.- Foster, A.C., Roberts, P.J., (1978). High affinity L-³H-glutamate binding to postsynaptic receptor sites on rat cerebellar membranes. J. of Neurochem., 31, 1467-1477.
- 21.- Simon, J.R., Contrera, J.F., & Kuhar, M.J., (1976). Binding of ³H-kainic acid, and analogue of L-glutamate, to Brain membranes. J. of Neurochem., 26, 141-147.
- 22.- Whithaker, U.P., The use of synaptosomes in the study of synaptic and neural membranes function. in: Pappas, G.D., (1972). Structure and function of synapses; Raven Press., New York., 87-100.
- 23.- Schwarcz, R., et. al., (1977). Kainic acid: Neurotoxic effects after intraocular injection. Invest. Ophthalm. 16-2, 141-148.
- 24.- Lowry, O.H., (1958). The quantitative histochemistry of the brain. J. Histochem. Cytochem., 1, 420-428.
- 25.- Pearse, A.G.E., (1961). Histochemistry (theoretical and applied); London, J. & A. Churchill.
- 26.- Pasantes-Morales, H. (1973). La taurine, mediateur ou modulateur présumé au niveau de la rétine; (tesis). Strasburgo, Francia. Univ. Louis Pasteur.
- 27.- Lowry, OH., (1951). Protein measurement folin whitth the fenol reagent. J. Biol Chem., 193, 265-275.

- 28.- Snyder, S.H., (1975). The glycine synaptic receptor in the mammalian central nervous system. Br. J. Pharmac., 53, 473-484.
- 29.- Young, B.A., (1975). The synaptic GABA receptor, in the mammalian central nervous system. Published in Symposium on GABA (1975); KROC Foundation. Calif. U.S.A.
- 30.- Enna, S.J., et. al., (1976). Gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor binding in mammalian retina. Brain Res. 115, 174-179.
- 31.- Urban, P.F., Dreyfus, H., & Mandel, P., (1976). Influence of various amino acids on the bioelectrical response to light stimulation of a superfused frog retina. Life Sci., 18, 473-480.
- 32.- Sickel, W., (1972). Retinal metabolism in dark and light. in: Handbook of sensory physiology, Vol. VII. Springer verlag, New York. pp. 667-727.
- 33.- Dowling, J.E., & Ripps, H., (1972). Adaptation in the skate photoreceptors. J. Gen Physiol., 60, 698-719.
- 34.- Ross, C.D., & McDougal, D.B., (1976). The distribution of choline acetyltransferase activity in the vertebrate retina. J. of Neurochem., 26, 521-526.
- 35.- López-Colomé, A. , (1976). Different effects of calcium flux-blocking agents on light and potassium stimulated release of taurine from retina. Brain Res., 113, 527-534.