

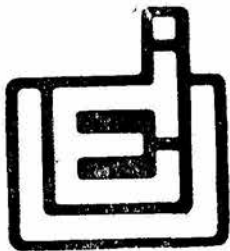


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

"Caracterización de los Sistemas de Captación de los Aminoácidos Glutamato y Aspartato Durante el Desarrollo Ontogénico de la Retina"

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MARIA DEL CARMEN VILCHIS QUINTERO



MEXICO. D. F.

1991



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

"CARACTERIZACION DE LOS SISTEMAS DE CAPTACION DE LOS AMINOACIDOS
GLUTAMATO Y ASPARTATO DURANTE EL DESARROLLO
ONTOGENETICO DE LA RETINA"

TRABAJO DE TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO PRESENTA:

MARIA DEL CARMEN VILCHIS QUINTERO

MEXICO, D. F.

1991.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mis agradecimientos a las siguientes personas que ayudaron a la realización de este trabajo:

A la Dra. Rocío Salceda Sacanelles directora de este trabajo.

Al M. C. Sergio González Moreno, al M. C. Ignacio Peñalosa Castro, al Biol. Enrique Bañuelos Sánchez y al Biol. Roberto Velasco García, sinodales de ésta tesis.

A mis compañeros y amigos.

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

INDICE

I. INTRODUCCION:	
La retina	
Estructura y Función	1
Embriología	7
Neurotransmisores	10
Glutamato y Aspartato	11
II. METODOS.....	20
III. RESULTADOS	
L-glutamato	23
D-aspartato	25
L-aspartato	27
Fracciones Sinaptosomales.....	27
Gráficas y Tablas	30
IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	41
V. BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUCCION.

La retina es una estructura especializada del sistema nervioso, la cual transduce la luz en señales biológicamente significativas, procesa estas señales y subsecuentemente transmite esta información al sistema nervioso central.

La retina se encuentra en el fondo del globo ocular, su superficie distal hace contacto con el epitelio pigmentario de la retina (EPR), el cual está en contacto directo con la coroides, y su superficie proximal se encuentra cercana al humor vitreo, del cual se separa por medio de una membrana limitante interna (figura 1), (Farber y Adler, 1986).

ESTRUCTURA Y FUNCION.

La retina neural consiste esencialmente de 6 tipos de neuronas: fotorreceptores, horizontales, bipolares, amacrinas, ganglionares e interplexiformes, que presentan una organización laminar. Los fotorreceptores (conos y bastones) se encuentran en contacto directo con el EPR, sus segmentos externos forman la capa fotorreceptora, sus somas celulares forman la capa nuclear externa. Las terminales de los fotorreceptores presentan algunas características particulares, tales como su gran tamaño y la existencia de una estructura electrodensa en forma de listón rodeada por pequeñas vesículas; dichas terminales forman contactos con los procesos de células horizontales y bipolares, formando la capa plexiforme externa. Los somas de las células horizontales, bipolares y amacrinas forman la capa nuclear interna. Los procesos de las células horizontales se ramifican en grandes áreas en la capa plexiforme externa, haciendo contactos con células bipolares, horizontales y fotorreceptores. En la capa

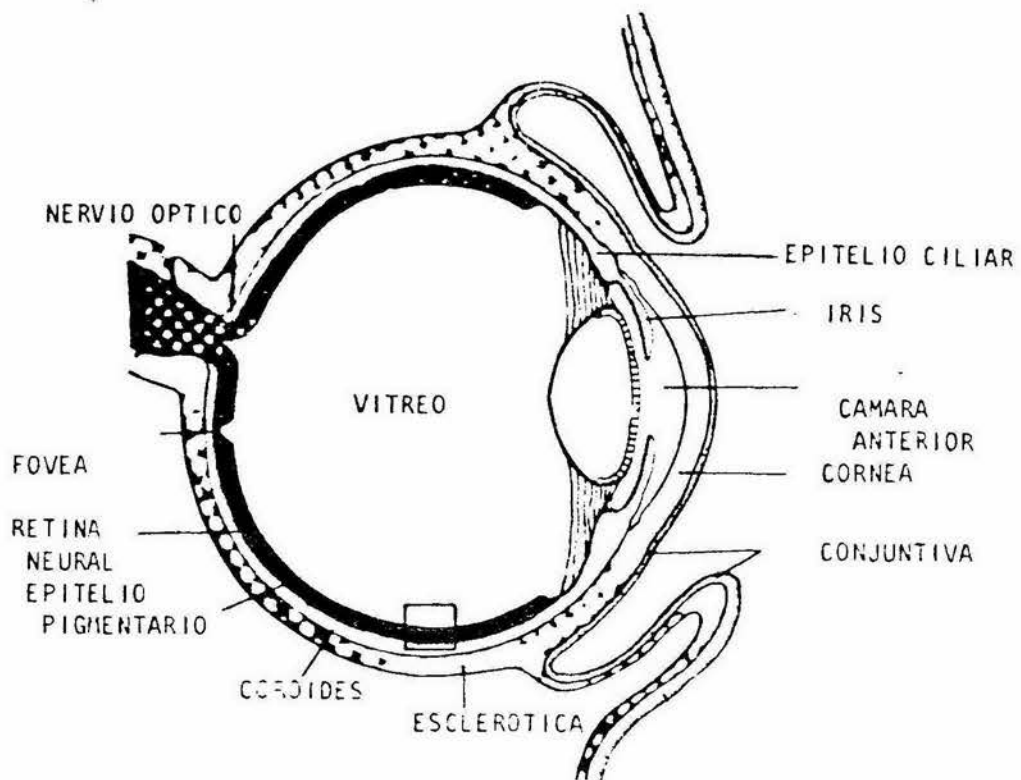


Figura 1. Diagrama de la sección transversal del ojo de los vertebrados. (Farber y Adler, 1986).

nuclear interna existen además los somas de las células interplexiformes, las cuales se caracterizan por tener procesos en ambas capas plexiformes, de tal manera que se crea un flujo de información entre ellas. La capa plexiforme interna está formada por las sinapsis de células bipolares, amacrinas y ganglionares. Las células ganglionares se encuentran en el margen interno de la retina y sus axones constituyen el nervio óptico (figura 2).

Las células de Müller son las células gliales de la retina, que se extienden desde la superficie vitreal hasta la capa de los fotorreceptores, en donde sus prolongaciones apicales se conectan con éstos y constituyen la membrana limitante externa; sus procesos basales forman la membrana limitante interna que aísla a las neuronas del cuerpo vitreo. Las células de Müller participan en el control extracelular de los niveles de potasio y en la eliminación de los neurotransmisores del espacio sináptico (Hertz, 1976; Barbour et al. 1988).

La presencia de un estímulo luminoso, produce en la retina una respuesta eléctrica rápida, negativa, denominada onda a, correspondiente a la hiperpolarización de los fotorreceptores, esta onda, es seguida por una onda lenta, positiva, denominada onda b, la cual se piensa es generada en las células de la capa interna. Frecuentemente se observa una onda c, que parece corresponder a la actividad del epitelio pigmentario de la retina (Brown, 1968).

En la retina, la luz actúa directamente sobre la rodopsina, proteína que se encuentra embebida en las membranas de los segmentos externos de los fotorreceptores, causando la isomerización del pigmento visual. Cuando la rodopsina absorbe un

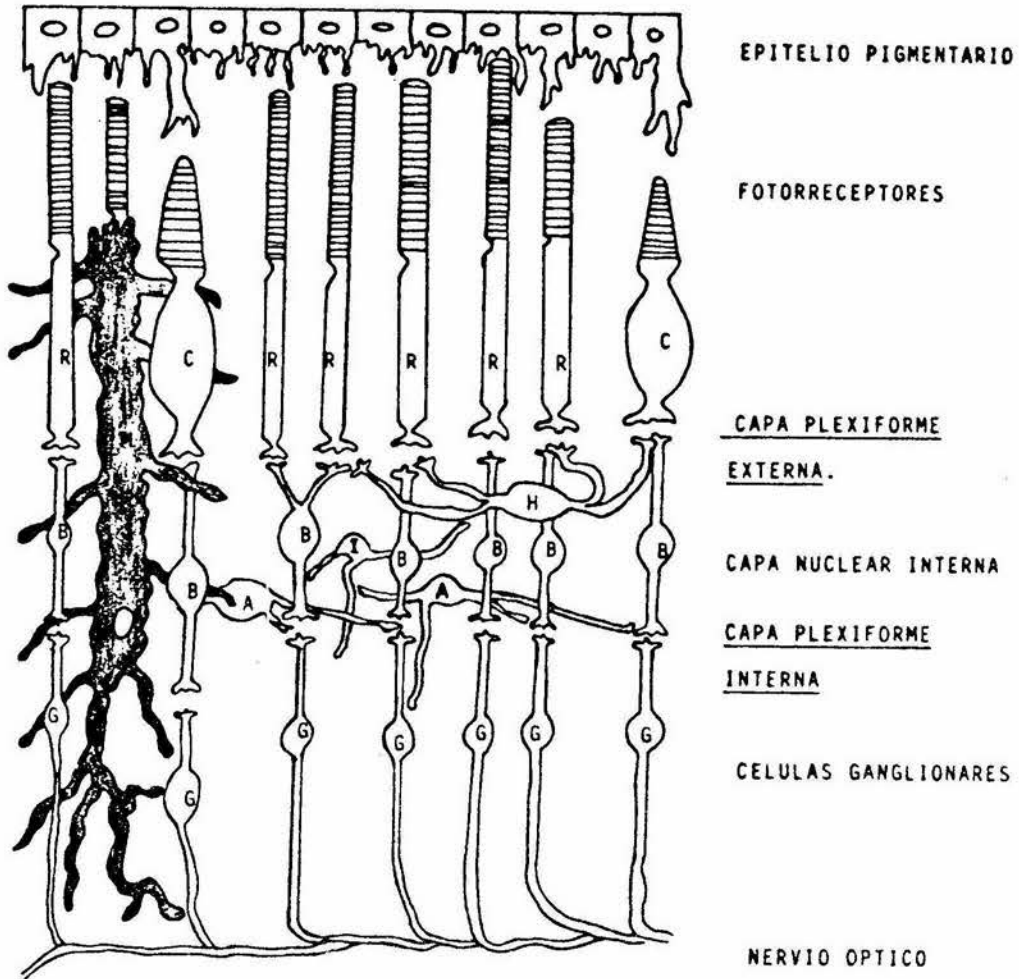


Figura 2. Diagrama de las capas de la retina y sus relaciones sinápticas. Los principales tipos celulares son designados como: R, bastones; C, conos; H, células horizontales; B, células bipolares; A, células amacrinas; G, células ganglionares; I, células interplexiformes; M, células de Müller.

fotón, ésta cambia su configuración, lo que lleva a una activación de la transducina o proteína G, la cual intercambia guanosín difosfato (GDP) por guanosín trifosfato (GTP) en una de sus subunidades. La transducina a su vez activa la enzima fosfodiesterasa (FDE), que hidroliza al guanosin monofosfato cíclico (GMPC). Un decremento de los niveles de GMPC, conduce a un incremento en la resistencia de la membrana, que lleva a una disminución en la entrada de iones sodio, causando así una hiperpolarización transitoria del fotorreceptor (figura 3).

En la oscuridad, los fotorreceptores presentan altas concentraciones de GMPC, el cual se une a los canales de sodio localizados en la membrana del segmento externo, permitiendo la entrada de sodio, creando así un flujo continuo de corriente, conocida como corriente oscura, la cual depolariza al fotorreceptor, provocando la liberación del neurotransmisor (Nakatani y Yau, 1985; Fesenko, et al., 1986).

Diversas evidencias ultraestructurales y electrofisiológicas han mostrado que las células fotorreceptoras liberan durante la oscuridad un transmisor químico y que la hiperpolarización producida por la luz conduce a la reducción de la liberación de dicho transmisor (Cervetto y Picolino; 1974; Dacheux y Miller 1976). El impulso eléctrico que se genera en los fotorreceptores se transmite en forma vertical a través de las células bipolares y ganglionares, esta información es modulada por la depolarización o hiperpolarización de las interneuronas inhibitoras, las células horizontales y las amacrinas, y sale de la retina a través del nervio óptico hacia los centros superiores

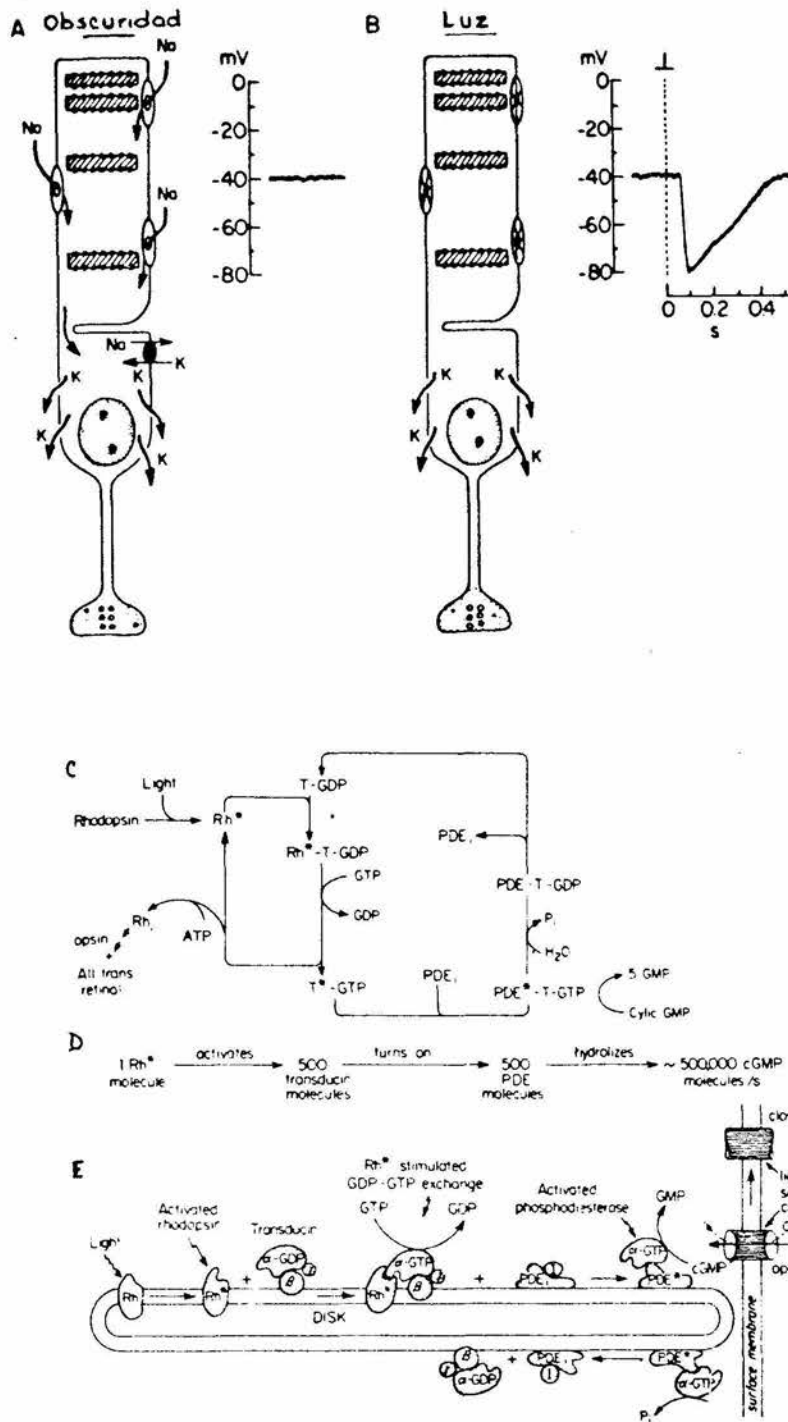


Figura 3. Mecanismo de la fototransducción: (A) Corriente oscura, entrada de iones sodio. (B) Proceso de transducción, los canales sensibles a luz se cierran. (C) Cascada de la rodopsina, (D) Estados de amplificación y (E). Cascada de nucleótidos como proteínas integrales y periféricas de la membrana de los discos del fotorreceptor.

de integración (Cohen, 1978).

En la retina, como en todo el sistema visual, las células responden en función de sus campos receptivos. Así, una población específica de fotorreceptores, cuya respuesta a la luz altera el comportamiento de cualquier neurona subsecuente en la cadena de información visual, constituye el campo receptivo de dicha neurona. Las células bipolares a las que los fotorreceptores transmiten son de dos tipos, las que responden a la luz hiperpolarizándose (bipolares Off) y las que con el mismo estímulo en sus campos receptivos se depolarizan (bipolares On). Existen evidencias anatómicas en algunas especies que indican que un sólo cono puede conducir tanto a bipolares On. como a las Off (Famiglietti, 1976; Stell, et al., 1977). Se ha demostrado que las células bipolares On forman contactos sinápticos con células ganglionares depolarizantes (On); mientras que las Off activan células ganglionares hiperpolarizantes (Off). Existe un tercer tipo de células ganglionares, que reciben señales de ambos tipos de células bipolares (On-Off), (Murakami, et al., 1975). Asumiendo que todas las células fotorreceptoras liberan un mismo transmisor, diferentes características en los receptores sinápticos son necesarias para explicar las diferentes respuestas de las células bipolares.

EMBRIOLOGIA:

La retina se deriva de la misma placa neural que da origen al cerebro. La placa neural presenta una depresión en su centro llamada surco neural, cuyos bordes convergen gradualmente y al fusionarse forman el tubo neural. La región anterior del tubo

neural se divide en 3 dilataciones conocidas como vesículas primarias: el procencéfalo, el mesencéfalo y rombencéfalo (Martin, 1989). El procencéfalo o cerebro anterior se subdivide en telencéfalo y diencéfalo, el cual da origen a las copas ópticas, cuerpos geniculados laterales, tallos ópticos y quiasma (figura 4a). La zona de la vesícula óptica opuesta a la superficie del ectodermo, prolifera y forma una depresión que invagina la porción distal y media inferior constituyendo la copa óptica, cuya concavidad está ocupada por la vesícula del cristalino que se origina de la superficie del ectodermo (figura 4b). La pared externa de la copa óptica permanece como una capa de células cuboidales que da origen al epitelio pigmentario de la retina, cuerpo ciliar e iris. La pared interna de la copa óptica prolifera y da origen a la retina, el epitelio ciliar no pigmentado y al epitelio posterior del iris (figura 4c). Diferentes estudios han identificado la aparición de los distintos tipos celulares de la retina en tiempos específicos durante el desarrollo. Así, se ha observado que las primeras células que se diferencian son las células ganglionares seguidas por las amacrinas, bipolares, horizontales y finalmente los fotorreceptores (Meller, 1979). El patrón morfológico es comparable con el fisiológico, ya que la respuesta eléctrica de la retina se observa una vez que se han formado los fotorreceptores. Con respecto a la aparición de las sinapsis y su funcionalidad existen diversas evidencias que indican que la presencia de diversos neurotransmisores, así como los mecanismos involucrados en su síntesis, acumulación, liberación y presencia de receptores postsinápticos correlaciona con la aparición de los

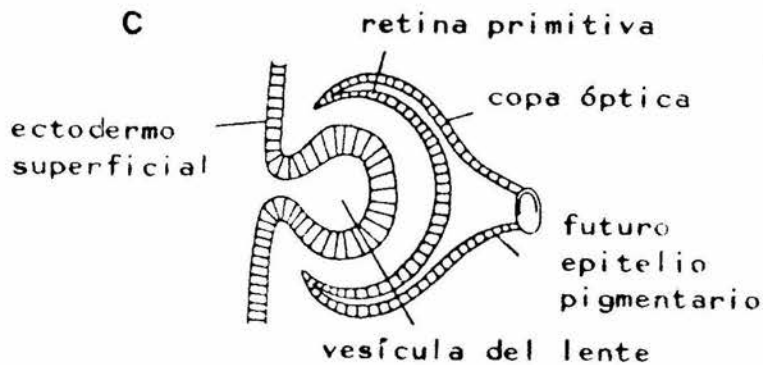
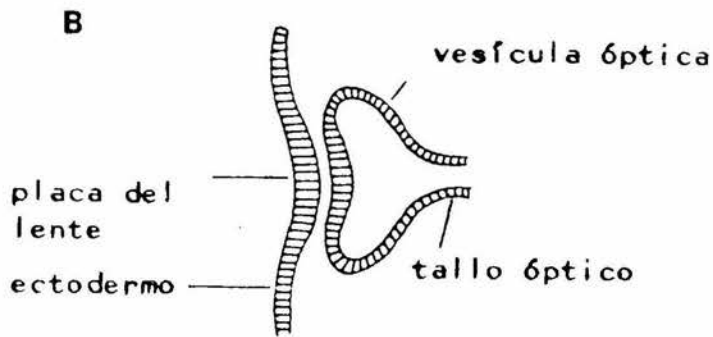
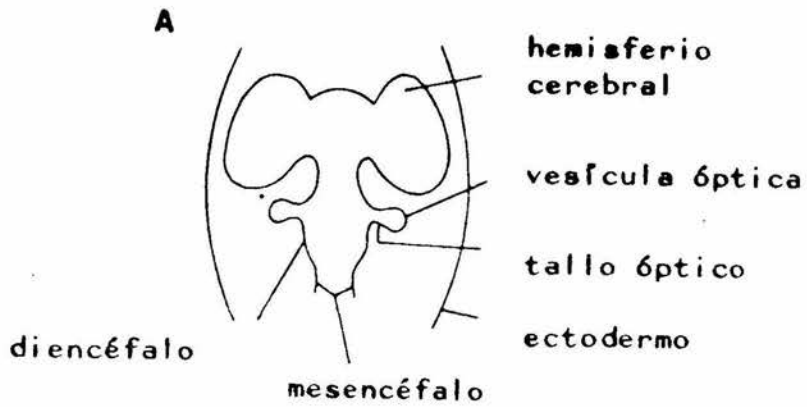


Figura 4. Representación esquemática del desarrollo de la retina y estructuras oculares relacionadas. La vesícula óptica aparece por la evaginación de la pared del diencéfalo (A y B). La invaginación de las vesículas ópticas conducen al desarrollo de una copa óptica constituida por dos capas celulares, la capa interna da lugar a la retina neural y la capa externa al epitelio pigmentario de la retina (C).

distintos tipos celulares (Fung, 1982; Grun, 1982; Marc, 1986). Sin embargo a la fecha no se conocen con precisión las distintas líneas celulares así como el tiempo en que el precursor adquiere sus características morfológicas y fisiológicas.

NEUROTRANSMISORES:

En la retina, al igual que en el cerebro, la comunicación entre las células ocurre principalmente a través de la transmisión química, mediada por neurotransmisores. Para considerar una sustancia como neurotransmisor, se ha propuesto que debe cumplir con los siguientes criterios (Werman, 1966):

1. El supuesto neurotransmisor debe estar presente en las terminales nerviosas.
2. Presencia de las enzimas involucradas en la síntesis de dicho neurotransmisor.
3. El compuesto debe ser liberado por estimulación presináptica e identificado en el fluido extracelular.
4. El compuesto propuesto deberá inducir en la célula postsináptica, el mismo efecto que el producido por el transmisor natural, por lo que deberá modificar la conductancia iónica de manera similar y a través de los mismos mecanismos que el transmisor endógeno.
5. Agentes farmacológicos que inhiban específicamente la síntesis, eliminación del espacio sináptico, liberación o interacción con el receptor postsináptico deben inhibir la transmisión sináptica.
6. Debe existir un mecanismo para la remoción del transmisor de la región postsináptica, ya sea por transformación química, difusión o recaptura.

Ninguna sustancia ha sido plenamente identificada como neurotransmisor en la retina, sin embargo existen evidencias que sugieren que la acetil colina (Graham, 1974; Neal 1976a), la dopamina (Ehinger y Falck, 1969; Kramer, 1976 y Dowling y Ehinger, 1978), la serotonina (Quay, 1965; Ehinger y Floren; 1978) y aminoácidos tales como el ácido gama aminobutírico (GABA) (Graham et al. 1970; Starr y Voaden, 1972; Brandon, 1979), la glicina (Voaden et al. 1974; Neal, 1976b; Salceda, 1989), el glutamato y el aspartato (Neal, 1976b), participan en la transmisión sináptica de éste órgano.

Diversas evidencias indican que el glutamato y/o el aspartato, probablemente son neurotransmisores de fotorreceptores, células bipolares y ganglionares (Miller et al. 1982; Miller y Schwarz, 1983). Por otro lado el GABA se ha propuesto como el neurotransmisor de las células horizontales (Murakami, 1978; Yazulla, 1983). En las células amacrinas se han propuesto una gran variedad de sustancias, tales como la glicina (Voaden 1977) acetilcolina (Vogel, 1977), dopamina (Redburn, 1979) y varios neuropeptidos, entre los cuales estan la sustancia P, encefalina, neurotensina y colecistoquinina (Li, et al. 1986; Watt, et al. 1985; Stone, 1987). Y en las células interplexiformes, los neurotransmisores propuestos son la dopamina y la glicina (Dowling y Ehinger, 1978; Marc, Lam y Stell, 1979).

GLUTAMATO Y ASPARTATO

Los aminoácidos glutamato y aspartato se han postulado como neurotransmisores excitadores en la retina, en la que se encuentran en altas concentraciones (Pasantes-Morales, 1972,

Starr, 1975; Macaione, 1974). Sin embargo, es de particular importancia mencionar que el glutamato y el aspartato participan en una variedad de funciones metabólicas de la célula, por lo que su presencia no es suficiente, para considerarlos como neurotransmisores.

Ambos, el glutamato y el aspartato son aminoácidos no esenciales que se sintetizan a partir de glucosa y otros precursores mediante el ciclo de los ácidos tricarbónicos. El glutamato se deriva del α -cetoglutarato mediante una aminación reductiva catalizada por la glutamato deshidrogenasa, por reacciones de transaminación de varios aminoácidos, o bien a partir de glutamina, por la actividad de la glutaminasa (figura 5).

La vía principal por la que se sintetiza el glutamato en el sistema nervioso parece ser a partir de glutamina. En estudios en los que se utilizaron glucosa y glutamina marcados radiactivamente se comprobó que el glutamato marcado que se libera por estimulación depolarizante con altas concentraciones de potasio (40 mM), proviene básicamente de glutamina. Además, se ha encontrado una alta actividad de la glutaminasa en terminales nerviosas y bajos niveles de glutamina, sugiriendo que las terminales sinápticas representan un sitio donde la glutamina es rápidamente convertida en glutamato (Morjaria y Voaden, 1979).

Por su parte el aspartato se sintetiza por transaminación, siendo el glutamato su precursor directo (figura 5).

El mecanismo por el cual el glutamato y el aspartato son liberados de las terminales nerviosas no se ha establecido, aunque al igual que otros neurotransmisores, el acoplamiento

excitación-secreción es mediado por un proceso exocitótico dependiente de calcio. Se ha demostrado que la liberación ocurre en presencia y ausencia de calcio extracelular, sugiriendo que el calcio de reservorios intracelulares puede ser utilizado (Shank y Aprison, 1979).

Después de que el glutamato se libera, este se debe eliminar rápidamente de la hendidura sináptica. Esto puede ocurrir mediante la combinación de 2 procesos:

1. Por recaptura en la terminal nerviosa.
2. Por difusión fuera de la hendidura y captación en las células gliales.

El glutamato es acumulado por células gliales en el sistema nervioso central (Hertz, 1979). Además es evidente que las células gliales poseen un sistema muy activo para transformar glutamato en glutamina por medio de la enzima glutamino sintetasa. Lo que ha llevado a sugerir que la captación de glutamato en células gliales puede terminar con la acción transmisora del glutamato, estableciéndose así una dinámica entre las neuronas glutamatérgicas y las células gliales (figura 5).

Estudios de microdissección de la retina demuestran que estos aminoácidos se concentran en la capa plexiforme externa y la capa ganglionar, aunque niveles moderados están presentes en las regiones internas de la retina (Kennedy y Voaden, 1974; Kennedy et al. 1977). Lowry en 1956, mostró una alta actividad de la enzima, glutamato-aspartato transaminasa en la capa de fotorreceptores, observación que fue apoyada posteriormente por Altschuler et al. (1982).

Se ha reportado que los niveles de glutamato y aspartato

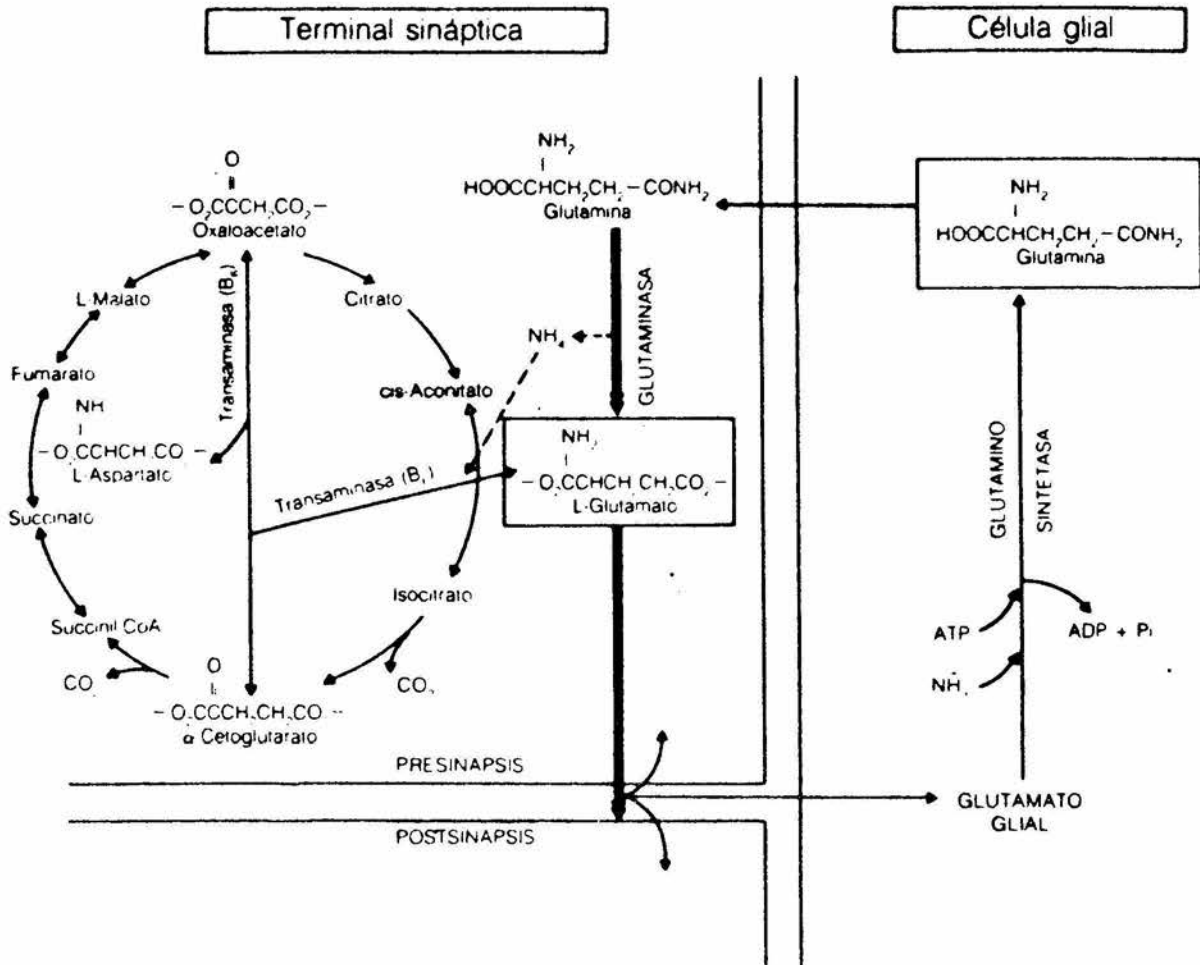


Figura 5. Metabolismo y Compartimentalización del glutamato en el Sistema Nervioso Central.

incrementan en la retina de animales adaptados a la luz (Voaden et al., 1980). Oraedu et al. en 1980 sugieren que este aumento puede ser un reflejo de la actividad metabólica de los fotorreceptores.

Las pruebas más convincentes de que el glutamato y el aspartato son neurotransmisores en la retina, proceden de su acción sobre las neuronas, cuando son aplicados iontoforéticamente. Así, Furakawa y Hanawa en 1955, demostraron en la retina de la rana, que el aspartato suprime la onda b del electrorretinograma, sin modificar la onda a. Estos resultados sugieren que los fotorreceptores son insensibles a estos aminoácidos. Posteriormente usando técnicas de registro intracelular, se encontró que el L-glutamato y el L-aspartato depolarizan a las células horizontales, sin ejercer ningún efecto sobre los fotorreceptores (Cervetto y Macnichel, 1972; Murakami et al., 1972; Sugawara y Nigishi, 1973), estableciendo que estos aminoácidos pueden funcionar como neurotransmisores de los fotorreceptores.

Por otro lado Murakami et al. (1975), demostraron en la retina de la carpa, que el L-glutamato y el L-aspartato aplicados exógenamente tienen respuestas de polaridad opuesta en los dos tipos de células bipolares caracterizadas fisiológicamente. Es decir las células bipolares-On se hiperpolarizan y las bipolares-Off se depolarizan, sugiriendo que estas diferencias se deben probablemente a especializaciones en los receptores postsinápticos.

En el sistema nervioso central se han clasificado a los receptores del glutamato en 3 subtipos, a saber: del tipo del

kainato (Ka), quisqualato (QQ) y sensibles a N-metil-D-aspartato (NMDA). Recientemente se describió una nueva clase de compuestos heterocíclicos análogos de los aminoácidos excitadores, derivados del ácido iboténico, que interactúan específicamente con los receptores de glutamato y aspartato, de tipo metabotrópico, asociado al inositol trifosfato y al diacilglicerol (Sugiyama, 1987).

La existencia de los receptores a aminoácidos excitadores en la retina, se ha podido comprobar mediante estudios electrofisiológicos, bioquímicos y de neurotoxicidad.

En la retina de anfibios, las células horizontales y las bipolares On y Off, muestran alta sensibilidad al ka y QQ, mostrando baja sensibilidad al NMDA. La acción de estos agonistas persiste en presencia de cobalto, indicando efectos directos sobre los receptores postsinápticos (Slaughter y Miller, 1983). Sin embargo, Wu y Dowling (1978) observaron que antagonistas del NMDA, inhiben la respuesta a la luz de células horizontales de la retina de ciprinidos.

Una población de células amacrinas y ganglionares son depolarizadas por Ka, QQ y NMDA. La depolarización causada por estos agentes persiste en presencia de cobalto, por lo que se sugiere una acción directa de estos aminoácidos, sobre los receptores postsinápticos de éstas células (Miller y Slaughter, 1983).

Los receptores a glutamato en la retina del pollo se han identificado y caracterizado bioquímicamente, demostrándose la unión de glutamato de manera dependiente e independiente de sodio (López-Colomé, 1981). Posteriormente López-Colomé y Somohano

(1982), demostraron con estudios de radioligando, la presencia de receptores de alta afinidad e independientes de sodio, para el D-aspartato, en las fracciones sinaptosomales P1 y P2 de la retina del pollo.

La presencia de estos receptores se ha establecido a través de estudios en los que la acción excitotóxica del ka se observó principalmente en células amacrinas (Coyle et al., 1981) y en menor grado en células horizontales, bipolares y ganglionares (Morgan e Inhgan, 1981; Schwarz, 1982; López-Colomé y Somohano, 1984). Estos resultados indican que varios tipos celulares utilizan al glutamato y al aspartato como neurotransmisores.

Similarmente la liberación de aspartato y de glutamato se ha demostrado en la retina de varias especies. La liberación del L-aspartato en la retina del conejo, es inhibida en presencia de un estímulo luminoso (Neal, 1979), sugiriendo que este se libera de las células fotorreceptoras. Resultados similares se observaron en la retina de anfibios (Miller et al. 1982)

Asimismo, Miller y Schwarz (1983), demostraron que el L-glutamato y el L-aspartato se liberan por estimulación con altas concentraciones de potasio (40 mM), de retinas en las que la actividad de las neuronas de la retina interna se inhibió con diferentes neurotoxinas. De acuerdo con dichos resultados, varios estudios muestran que el L-glutamato y el L-aspartato inducen la liberación de GABA de células horizontales de la retina del pez dorado; estos resultados apoyan la idea de que estos aminoácidos se liberan de células fotorreceptoras (Yazulla, 1983). Por otro lado, Ikeda y Sheardon (1982) sugieren que en la retina del gato,

el L-aspartato y/o L-glutamato se liberan de células bipolares On y Off y de células ganglionares.

La acción postsináptica del neurotransmisor liberado es terminada por la remoción del mismo de la hendidura sináptica a través de un transporte de alta afinidad, dependiente de sodio, características que se consideran particulares de los neurotransmisores (Mudler y Snyder, 1974).

La localización autoradiográfica de la captación de L-glutamato-³H y L-aspartato-³H, en la retina de varias especies sugiere la presencia de tales sitios de transporte en los fotorreceptores. Marc y Lam en 1981, demostraron una clara acumulación de L-glutamato y L-aspartato en bastones y conos de la retina del pez dorado. De manera similar en la retina del gato, mono y humano se encontró la acumulación de estos aminoácidos en terminales y somas celulares de los fotorreceptores. Sin embargo, en otras especies de mamíferos Brunn y Ehinger (1974), encontraron que el glutamato se acumula preferencialmente en células gliales. El D-aspartato, análogo no metabolizable, es acumulado en los fotorreceptores de la retina del pez dorado (Marc y Lam, 1981) del cuyo y del conejo (Ehinger, 1981) así como en células ganglionares; y puede ser liberado por estimulación con altas concentraciones de potasio, de manera dependiente de calcio.

Por otro lado, en la retina de la rata albina se reportó la presencia de un sistema de captación para el L-glutamato y para el L-aspartato, de alta afinidad y dependiente de sodio (Neal, et al. 1973; White y Neal, 1976; y Neal y White, 1971). En la retina

de conejo, los sistemas de captación del L-aspartato son inhibidos por el L-glutamato y viceversa, sugiriendo un sistema de transporte común para ambos aminoácidos (Thomas y Redburn, 1978). Aunque existen reportes referentes al sistema de transporte de L-glutamato y L-aspartato, éstos son escasos y no han sido totalmente caracterizados, por lo que en el presente estudio se pretendió caracterizar el sistema de transporte de estos aminoácidos, su establecimiento durante el desarrollo del pollo y de la rata, así como su localización en terminales sinápticas provenientes de diferentes tipos celulares de la retina.

METODO:

Las retinas se obtuvieron de pollos de la variedad Rirr-Barr de 2 a 15 días de edad. Así mismo, se utilizaron retinas de embriones de pollo de diferentes días de incubación (7, 10, 15, 18 y 21) y de ratas Long-Evans de 5, 8, 10, 15, 30 y 70 días de edad.

Los animales adaptados a la obscuridad se decapitaron y los ojos se extirparon rápidamente, éstos se seccionaron ecuatorialmente y la parte anterior de ellos fue eliminada. Las retinas se disecaron en Ringer Krebs Bicarbonato (RKB) con una composición (mM) de NaCl 118; KCl 4.7; KH_2PO_4 1.17; CaCl_2 2.5; MgSO_4 1.17; glucosa 5.6; NaHCO_3 25 a un pH de 7.4, oxigenado con una mezcla de O_2 al 95% y CO_2 al 5%.

ACUMULACION DE L-GLUTAMATO- ^3H Y D-ASPARTATO- ^3H .

Los experimentos de acumulación de los aminoácidos radiactivos se llevaron a cabo a 37°C en la obscuridad. El tejido se incubó por diferentes tiempos (2, 5, 10, 20 y 40 min.) en 1 ml. de RKB que contenía L-glutamato- ^3H , D-aspartato- ^3H o L-aspartato- ^3H (0.25 μCi , con una actividad específica de 69 Ci/mmol, 13.1 Ci/mmol y 13.5 Ci/mmol, respectivamente, New England Nuclear, USA). Al final de la incubación el tejido se lavó durante 1 min en RKB normal a 4°C y posteriormente se pesó y digirió con 0.5 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% a 40°C durante 30 min. Una vez digerido el tejido se le agregaron 5 ml de tritosol (Fricke, 1975), y la radiactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo líquido (Beckman, LS 1701).

Para medir la cinética del transporte, se incubó el tejido durante 2 min en RKB, en presencia de diferentes concentraciones del aminoácido (2-500 μ M).

Se probó el efecto del sodio sobre la acumulación de los aminoácidos radiactivos, substituyendo el cloruro de sodio por cloruro de colina, y el bicarbonato de sodio por bicarbonato de potasio.

Se probó el efecto de inhibidores metabólicos y análogos de estos aminoácidos sobre el sistema de captación de los mismos, adicionando dichos compuestos simultaneamente al aminoácido radiactivo.

FRACCIONACION SUBCELULAR DE LA RETINA.

Las fracciones sinaptosomales de la retina del pollo, se obtuvieron después de que éstas se homogeneizaron al 5.6% (p/v), en una solución de sacarosa 0.3 M - $MgSO_4$ 0.1 mM. El homogenado se centrifugó 2 veces durante 10 min a 500 rpm/min, en una centrífuga CRU 5000 (International Equipment Co.,: Nead Ham Heights, M.A.) La pastilla se desechó y los sobrenadantes se mezclaron y centrifugaron durante 10 min. a 850 x g en una centrífuga Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments). El sedimento se resuspendió en sacarosa- $MgSO_4$ y se centrifugó nuevamente a 850 x g por 10 min. El sedimento resultante constituye la fracción P1, que contiene terminales sinápticas de las células fotorreceptoras. Los sobrenadantes de estas centrifugaciones se mezclaron y se centrifugaron a 11, 000 x g durante 20 min; el sedimento así obtenido corresponde a la fracción P2, constituida principalmente por sinaptosomas de la capa plexiforme interna. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C (Salceda, 1989).

Las fracciones sinaptosomales (100 μg de proteína) se incubaron a 37°C en 0.5 ml de RKB que contenía 0.25 μCi del aminoácido radiactivo, durante diferentes períodos de tiempo (2, 5 y 10 min.). Al finalizar la incubación las muestras se centrifugaron a 10, 000 rpm por 30 seg. en una microfuga Beckman. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó superficialmente con RKB frío. El paquete se digirió con SDS 0.1% durante 10 min. y la radiactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo líquido, después de la adición de tritosol.

La concentración de proteínas en las muestras, se determinó de acuerdo al método de Lowry (1951), que utiliza albúmina de suero de bovino como estándar.

La significancia de los datos experimentales se calculó por medio de la prueba de Anova Unifactorial (análisis de varianza) y las pruebas de Duncan.

RESULTADOS.

L-GLUTAMATO

El glutamato-3H se acumula en la retina, a través de un sistema saturable en función del tiempo de incubación, alcanzando la saturación a los 10 min, con valores de 79 nmolas/g. en la retina del pollo y de 130 nmolas/g en la retina de la rata (gráfica 1).

Con el objeto de estudiar la cinética del transporte del L-glutamato-3H, se incubó el tejido en presencia de diferentes concentraciones del aminoácido (5-200 μM). Bajo estas condiciones la acumulación del glutamato es saturable (gráfica 2). El análisis de Lineweaver-Burke, mostró un sólo sistema de transporte, con una K_m aparente de 100 μM para ambas especies, y una V_{max} de 157 nmolas/g./min. en la retina del pollo y de 100 nmolas/g./min. en la retina de la rata (gráfica 3A).

El sistema de transporte de L-glutamato-3H es sensible a la temperatura, la incubación a 4°C causó una inhibición del 85% en la retina del pollo y del 95% en la de la rata (tabla 1). La dependencia de energía en el transporte de L-glutamato-3H se estudió incubando las retinas en presencia de diferentes inhibidores metabólicos. La presencia de 1 mM de iodoacetato (Iac), inhibió considerablemente la acumulación de L-glutamato-3H en la retina del pollo (75%) y en la de la rata (45%). Por otro lado, la ouabaina (0.1 mM) también inhibió de manera importante (55%) la acumulación del aminoácido en ambas especies. Sin embargo, no se observó ningún efecto sobre la acumulación de éste aminoácido, en presencia de cianuro de potasio (KCN, 1mM) o dinitrofenol (DNP, 1 mM) ($p < 0.05$) (tabla 1).

La especificidad del sistema de transporte, se determinó por el efecto de diferentes análogos sobre la acumulación de L-glutamato-3H. El L-aspartato (200 μM), L-hidroxamato de glutamato (500 μM) y DL-monohidroxamato de aspartato (500 μM), causaron una inhibición del 70%, 22% y 59% respectivamente, en la acumulación de L-glutamato-3H en la retina de rata y en la del pollo la inhibición fue de 49%, 25% y 35%. Por otro lado el D-aspartato inhibió considerablemente (60%) la acumulación en la retina de la rata, mientras que en la retina del pollo sólo se observó un ligero decremento en los niveles de L-glutamato acumulado. De manera diferente, la presencia de GABA (1 mM) y ácido L- α -aminoadípico (1 mM) no causó ningún cambio significativo en la acumulación de L-glutamato-3H. Por su parte el Ka (200 μM) causó una inhibición del 20% en la retina de la rata sin tener efecto en la retina del pollo ($p < 0.05$) (tabla 1).

La acumulación de L-glutamato-3H presentó variaciones durante el desarrollo. En la retina de embriones de (7-10 días) se observó una captación dos veces mayor que la encontrada en estadios posteriores (gráfica 4A). Mientras que en la retina de la rata, los niveles de acumulación de L-glutamato-3H se mantuvieron relativamente constantes durante los periodos estudiados, sin embargo se observó un aumento importante del 5° al 10° día de edad.

El sistema de transporte de los aminoácidos neurotransmisores se ha demostrado que es dependiente de las concentraciones externas de sodio, por lo que se estudió dicha dependencia en el sistema de transporte de L-glutamato-3H en la

retina. Para ello, las retinas se incubaron en un medio en el cual se substituyó el cloruro de sodio por cloruro de colina (118 mM). Bajo estas condiciones, la acumulación de L-glutamato-3H en la retina del pollo, mostró una dependencia total (95%) por el sodio al 7° día de desarrollo embrionario; sin embargo en estadios posteriores la dependencia de sodio disminuyó en un 50%. Por otro lado en la retina de la rata, el sistema de captación del L-glutamato-3H mostró una dependencia absoluta por el sodio, dependencia que se observó en todos los estadios del desarrollo estudiados (gráfica 4b).

D-ASPARTATO:

El D-aspartato es un análogo no metabolizable del L-glutamato, que parece transportarse por el acarreador del glutamato (Balcar y Johnston, 1972). Debido al activo metabolismo del glutamato, el D-aspartato se ha utilizado ampliamente en diversos estudios relacionados con el posible papel del glutamato como neurotransmisor, por tal motivo nosotros caracterizamos el sistema de captación del D-aspartato-3 en la retina, encontrando que éste es saturable en función del tiempo de incubación, con un máximo de acumulación de 158 nmolas/g. a los 10 min. en la retina del pollo; mientras que en la retina de la rata, la máxima acumulación fue observada a los 20 min. (280 nmolas/g.) (gráfica 1).

Cuando el tejido se incubó con diferentes concentraciones del D-aspartato (5-200 μ M), se encontró que el sistema de transporte es saturable (gráfica 2). La gráfica de Lineweaver-Burke mostró un sólo sistema de transporte con una Km aparente de 100 μ M para ambas especies y una Vmax de 175 nmolas/g./min.

para la retina del pollo y de 220 nmolas/g./min. para la de la rata (gráfica 3B).

En la retina de ambas especies estudiadas, la incubación a bajas temperaturas (4°C), causó una inhibición del 95% en la acumulación de D-aspartato-3H ($p < 0.05$) (tabla 2).

Por otro lado, el iodoacetato (Iac, 1 mM) inhibió marcadamente la acumulación del aminoácido, en ambas especies (50-80%). La presencia de ouabaina (0.1 mM) disminuyó un 75% la acumulación de D-aspartato-3H en la retina del pollo y un 40% en la retina de la rata. Mientras que, el cianuro de potasio (KCN), y el dinitrofenol (DNP), causaron en la retina de la rata una inhibición del 35% y 23%, respectivamente; en la retina del pollo la acumulación de D-aspartato-3H se inhibió en un 48% y 57% por KCN y DNP, respectivamente ($p < 0.05$) (tabla 2).

La especificidad del sistema de transporte, se estudió midiendo la acumulación de D-aspartato-3H en presencia de diferentes aminoácidos que presentan una estructura similar a la del D-aspartato. En la retina del pollo, el L-glutamato (200 μ M) no tuvo ningún efecto en la acumulación de D-aspartato-3H, en cambio, en la retina de la rata éste causó un decremento considerable del 75%. Por su parte el L-aspartato (200 μ M) produjo una disminución del 30% en la retina del pollo y del 60% en la retina de la rata. De igual manera, el hidroxamato de glutamato (500 μ M) y el monohidroxamato de aspartato (500 μ M) tienen efectos notables sobre la acumulación, la que es inhibida un 30% y un 50% respectivamente en la retina de ambas especies estudiadas. La presencia de GABA (1mM), taurina (1 mM) y ácido L- α -aminoadípico (1 mM), causaron una ligera inhibición en la

acumulación de D-aspartato-3H en ambas especies. El k_a , sin embargo, causó una inhibición del 50% en la retina del pollo ($p < 0.05$) (tabla 2).

La captación de D-aspartato-3H durante el desarrollo del pollo, presentó varios cambios durante los estadios estudiados, sin embargo no son estadísticamente significativos (gráfica 5A). Similarmente, en la rata no se observaron cambios en los niveles de acumulación en las edades estudiadas (gráfica 5B).

La captación de D-aspartato-3H, disminuyó en un 50% en ausencia de sodio. Esta dependencia por el sodio se observó en la retina de ambas especies en todas las edades estudiadas (gráfica 6).

L-ASPARTATO:

El sistema de transporte de L-aspartato-3H, es saturable en función del tiempo de incubación, alcanzando su máxima acumulación a los 20 min de incubación, con valores de 78 nmolas/g y 58 nmolas/g en la retina del pollo y de la rata, respectivamente (gráfica 1).

Con el objeto de conocer la cinética del transporte del L-aspartato-3H, se incubaron las retinas con diferentes concentraciones del aminoácido (5-200 μM). Bajo estas condiciones la acumulación es saturable (gráfica 2). El análisis de Lineweaver-Burke, mostró un sólo sistema de transporte, con una K_m aparente de 100 μM en ambas especies y una V_{max} de 160 nmolas/g/min en la retina del pollo y de 132 nmolas/g/min, en la de la rata (gráfica 4c).

FRACCIONES SINAPTOSOMALES

En un intento por identificar las zonas de las células de la

retina que presentan los sistemas de transporte de los aminoácidos excitadores, se estudió la acumulación del L-glutamato y del L-aspartato en las fracciones sinaptosomales P1 (constituída principalmente por terminales sinápticas de los fotorreceptores) y P2 (formada por sinaptosomas de la capa plexiforme interna) de la retina del pollo.

El transporte de L-glutamato-3H mostró en ambas fracciones ser un sistema saturable (gráfica 6 y 7). La gráfica de Eadie-Hufstee evidenció 2 sistemas de transporte en la fracción P1, uno con K_m aparente de $29 \mu M$ y una V_{max} de $3.4 \text{ nmolas/mg de proteína/min}$ y otro de mayor afinidad con una K_m de $2.6 \mu M$ y una V_{max} de $0.6 \text{ nmolas/mg de proteína/min}$ (gráfica 8A). La fracción P2 mostró un sólo sistema con una K_m de $68 \mu M$ y una V_{max} de $1.5 \text{ nmolas/mg de proteína/min}$. (figura 8B).

La acumulación de L-glutamato-3H en la fracción P1 se vió considerablemente inhibida (50-65%) en presencia de Iac (1 mM) y ouabaina (0.1 mM) o cuando se incubó a $4^\circ C$. Sin embargo, la presencia de KCN (1 mM) no provocó ningún cambio en los niveles de acumulación de L-glutamato-3H. De manera diferente, la acumulación de éste aminoácido en la fracción P2 no se vió afectada por ninguno de estos inhibidores metabólicos (tabla 3).

En ambas fracciones, la acumulación de L-glutamato-3H presentó una disminución del 85% en ausencia de sodio en el medio de incubación ($p < 0.05$) (tabla 3).

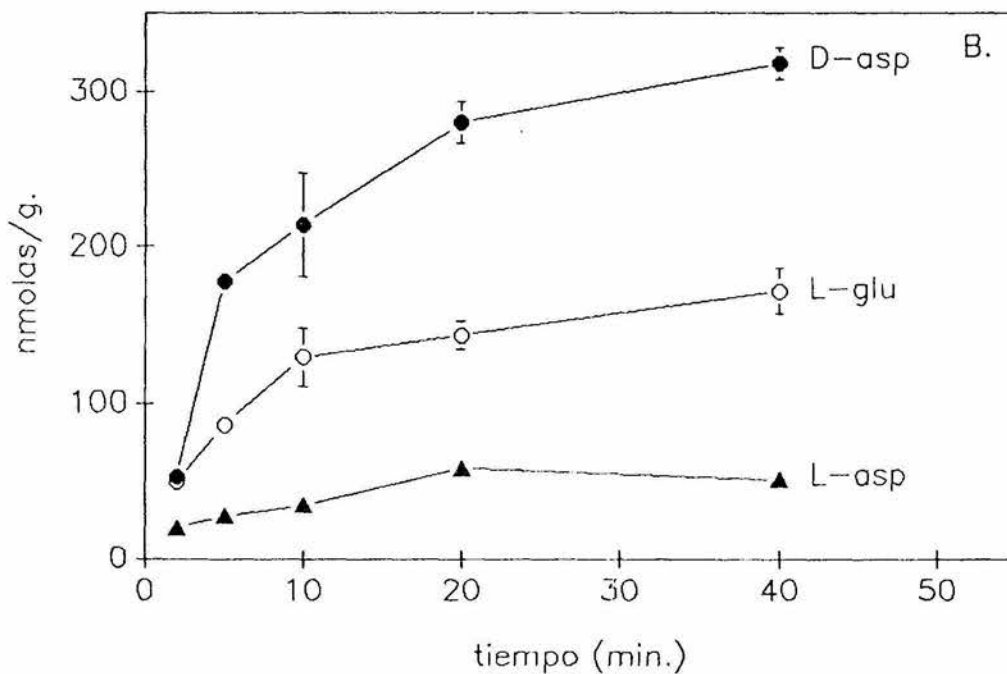
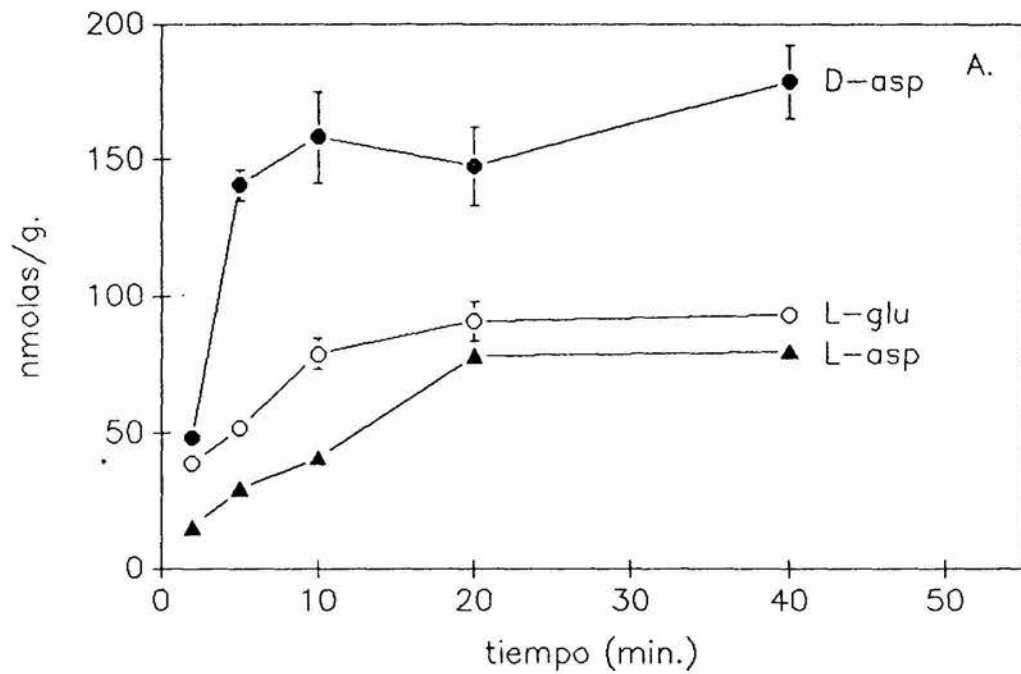
El L-aspartato ($200 \mu M$), el D-aspartato ($200 \mu M$) y el hidroxamato de aspartato, causaron una inhibición significativa en ambas fracciones, mientras que el hidroxamato de L-glutamato no

tuvo ningún efecto ($p < 0.05$) (tabla 3).

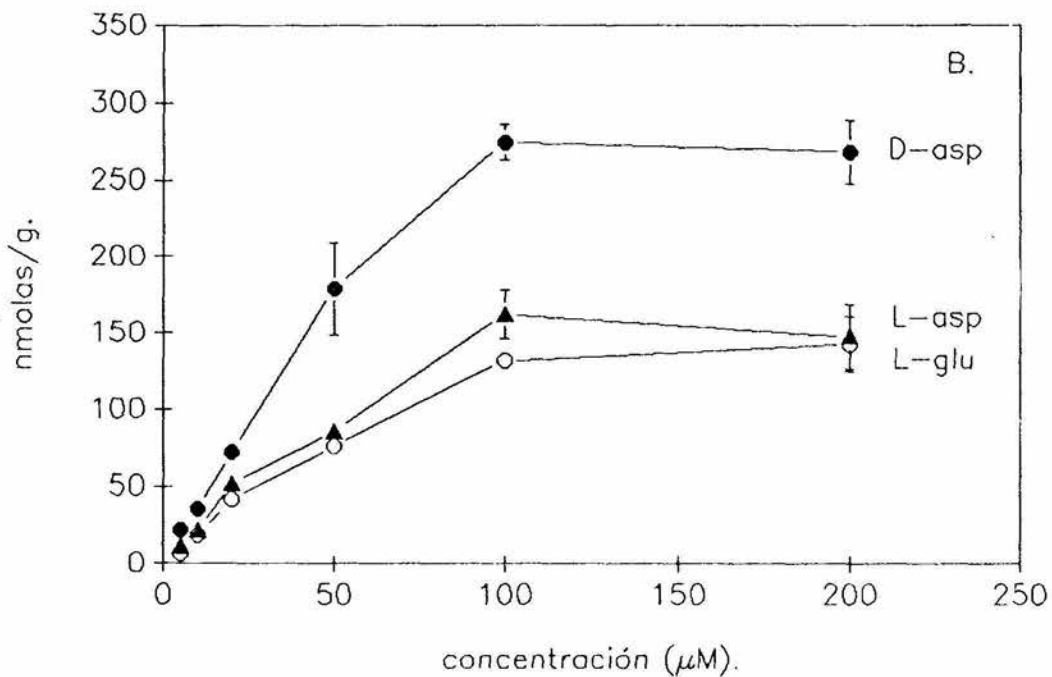
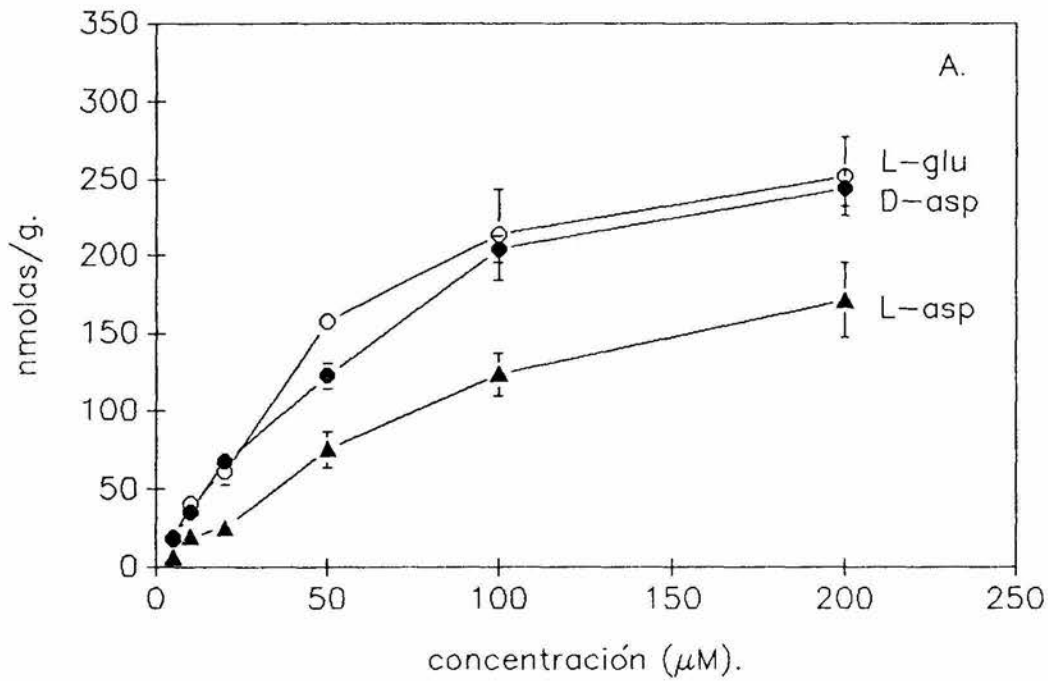
L-ASPARTATO.

En las fracciones P1 y P2 la acumulación de L-aspartato-3H mostró características similares a las observadas para el L-glutamato-3H (gráfica 6 y 7). La fracción P1 presentó 2 sistemas de transporte, uno de alta afinidad (K_m de $2.5 \mu M$) y otro de menor afinidad (K_m de $106 \mu M$) con una V_{max} de 1 y 10.2 nmolas/mg de proteína/min, respectivamente (gráfica 8C). Mientras que en la P2 sólo se observó un sistema de transporte con una K_m de $35 \mu M$ y una V_{max} de 9.3 nmolas/mg de proteína/min (gráfica 8D). En ambas fracciones, la acumulación de L-aspartato-3H se inhibió notablemente a bajas temperaturas y en ausencia de sodio y en menor grado por Iac y ouabaina ($p < 0.05$) (tabla 3).

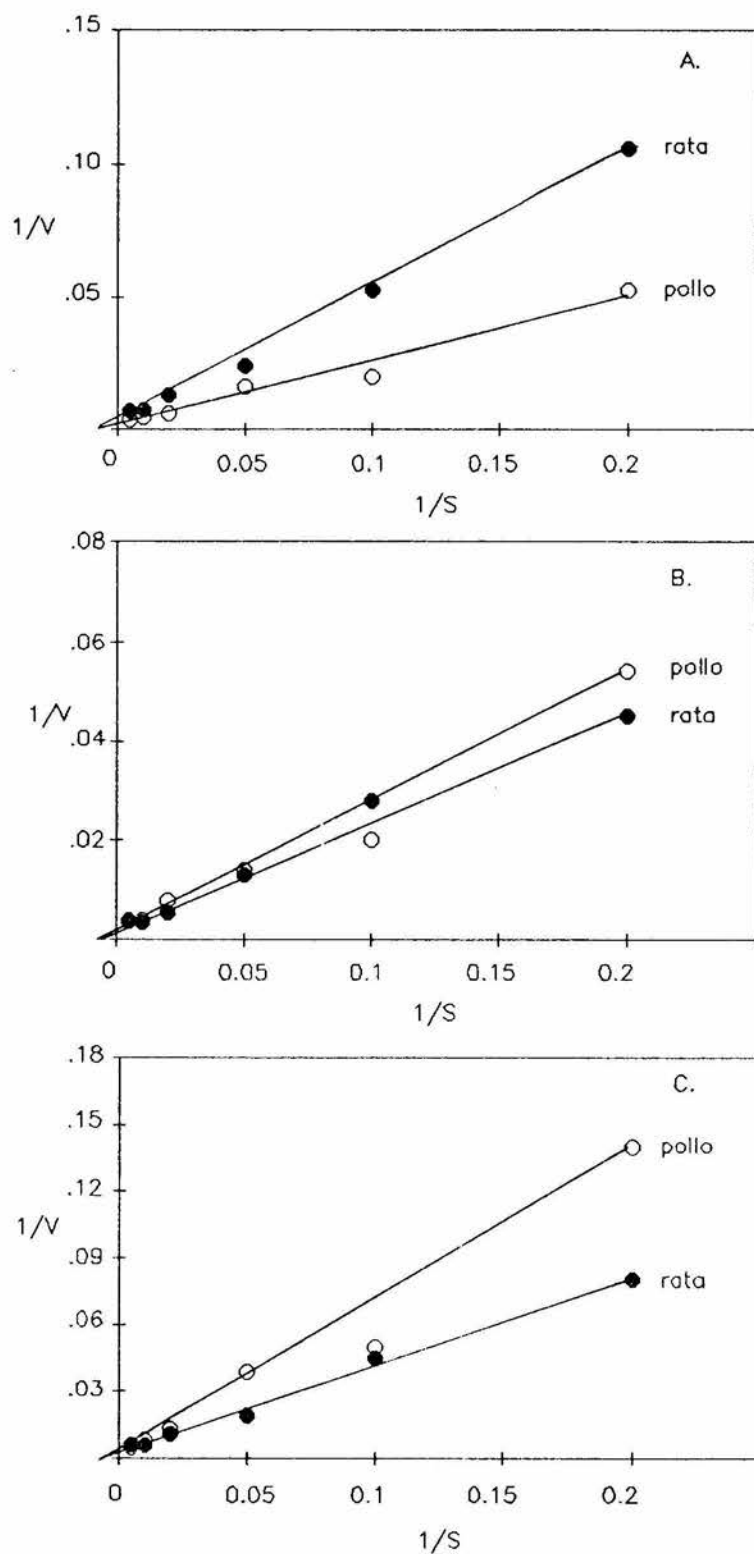
Los niveles de acumulación del L-aspartato-3H en las fracciones P1 y P2, no presentaron cambios considerables en presencia de ácido L- α -aminoadípico (1 mM). En cambio, el L-glutamato ($200 \mu M$) y el hidroxamato de aspártico ($500 \mu M$), causaron una inhibición del 75%; mientras que el hidroxamato de glutamato causó en ambas fracciones un decremento del 25% ($p < 0.05$) (tabla 3).



Gráfica 1. Acumulación de L-glutamato-3H (o), D-aspartato-3H (●) y L-aspartato-3H (▲), en función del tiempo de incubación, en la retina del pollo (A) y de la rata (B). Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes \pm el error estándar.



Gráfica 2. Acumulación de L-glutamato-3H (o), D-aspartato-3H (●), y L-aspartato-3H (▲), en presencia de diferentes concentraciones del aminoácido, en la retina del pollo (A) y de la rata (B). El tiempo de incubación fue de 2 min. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes \pm el error estándar.

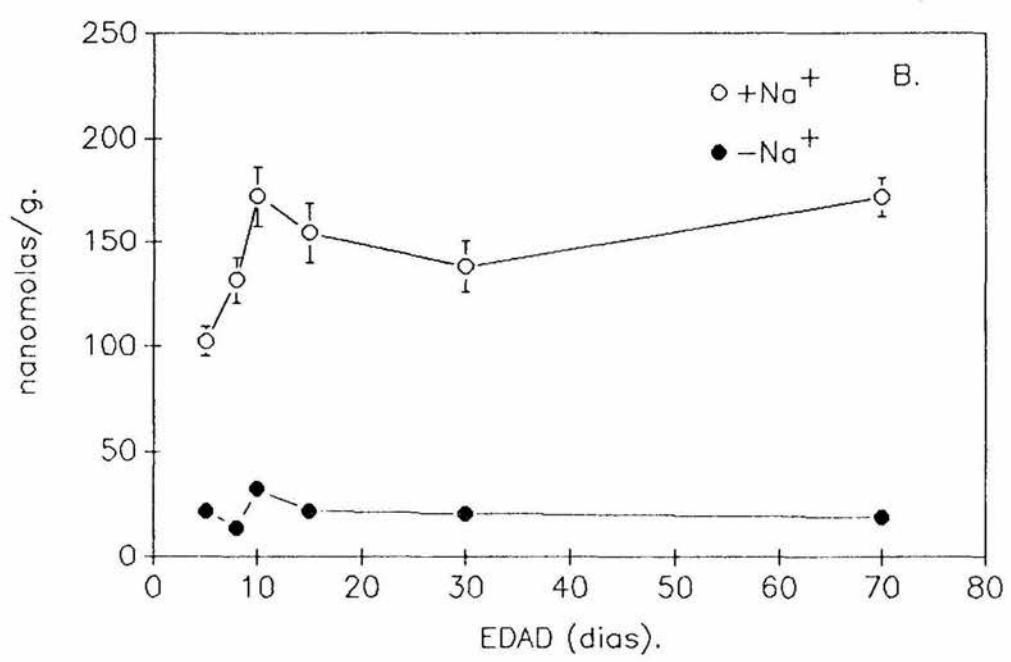
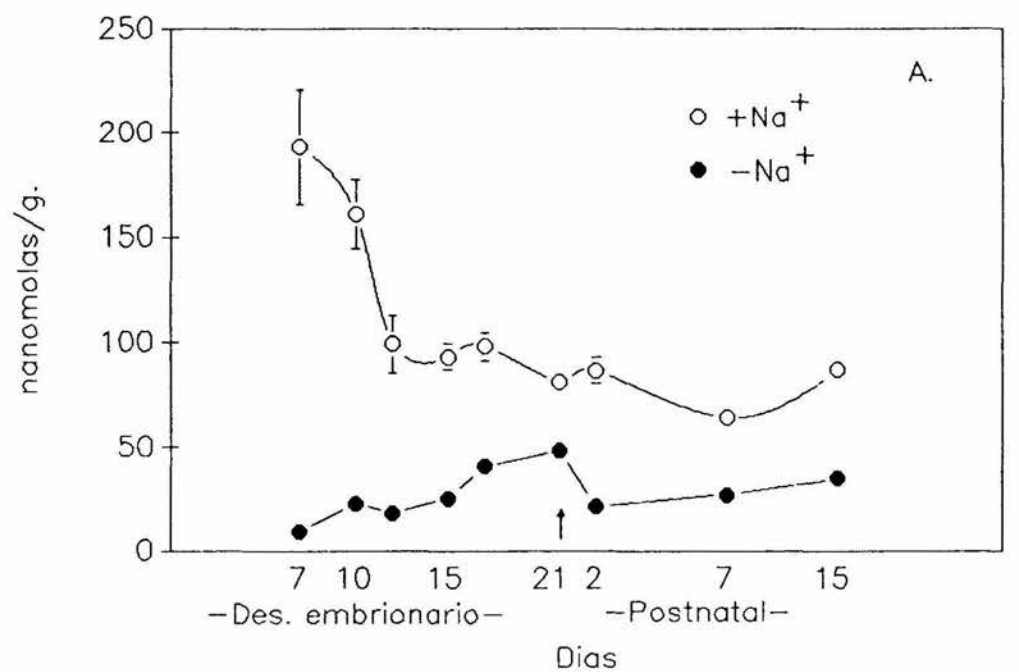


Gráfica 3. Gráfica de Lineweaver-Burke de la acumulación de L-glutamato-3H (A), D-aspartato-3H (B) y L-aspartato-3H (C), en la retina del pollo (o) y de la rata (●). Los experimentos son el promedio de 3 experimentos independientes.

TABLA 1
 EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE
 LA ACUMULACION DE L-GLUTAMATO-3H.

Condiciones de incubación.	(% de inhibición)	
	Pollo	Rata
4°C	87 ± 2.6*	93 ± .87*
Cianuro de potasio (1mM)	30 ± 3.5	57 ± 10.9
Dinitrofenol (1 mM)	22 ± 8.5	28 ± 9.7
Iodoacetato (1 mM)	74 ± 3.4*	44 ± 2.6*
Ouabaina (0.1 mM)	61 ± 2.2*	75 ± 3.2*
Taurina (1 mM)	0	0
GABA (1 mM)	5 ± 7.3	0
L-α-aminoadípico (1 mM)	0	0
Kainato (200 μM)	3 ± 6.8	20 ± 6.7
L-aspartato (200 μM)	49 ± 8.5*	70 ± 1.6*
D-aspartato (200 μM)	17 ± 1.5	61 ± 3*
L-glutamato-hidroamato (500 μM)	25 ± 6.1	22 ± 6.5
L-aspartato-β-hidroxa- mato (500 μM)	35 ± 10 *	59 ± 6.8*

La acumulación de L-glutamato-3H (20 μM) se llevó a cabo a 37°C durante 20 min. Los valores son el promedio de 5 experimentos independientes ± el error estándar. * P<0.05 comparado con el control.



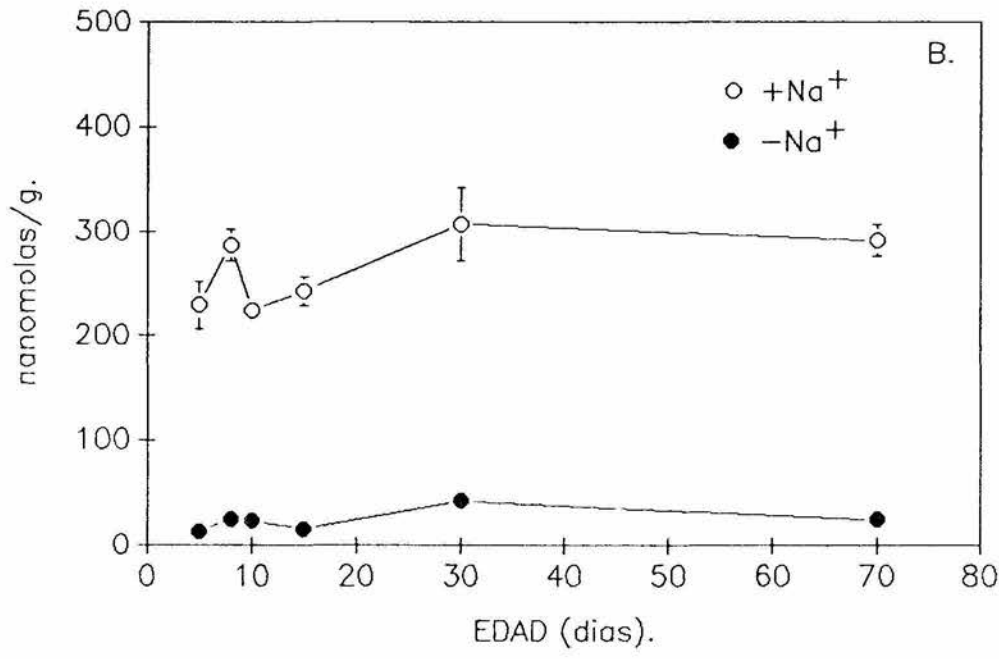
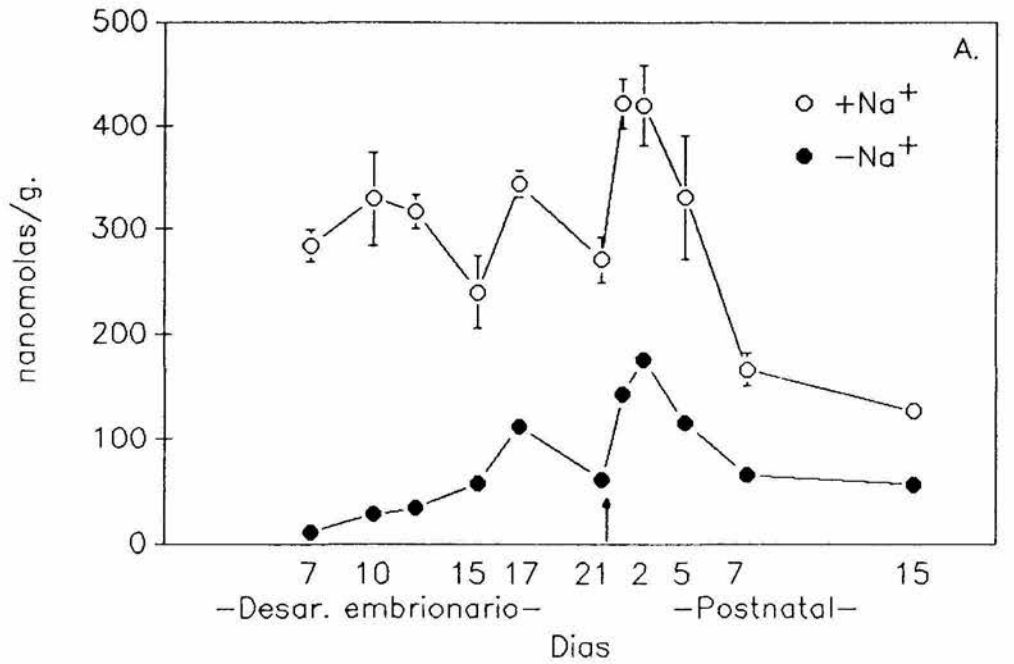
Gráfica 4. Acumulación de L-glutamato-3H (20 μM) en la retina del pollo (A) y de la rata (B) durante el desarrollo. El sodio se substituyó por cloruro de colina (118 mM). Los datos son el promedio de 5 experimentos independientes ± el error estándar.

TABLA 2

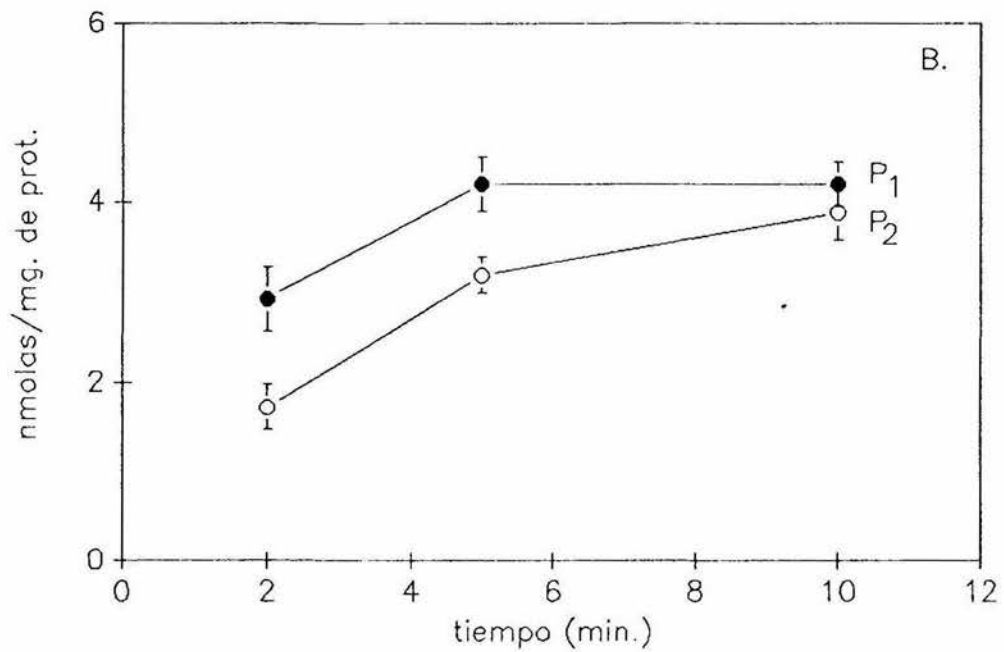
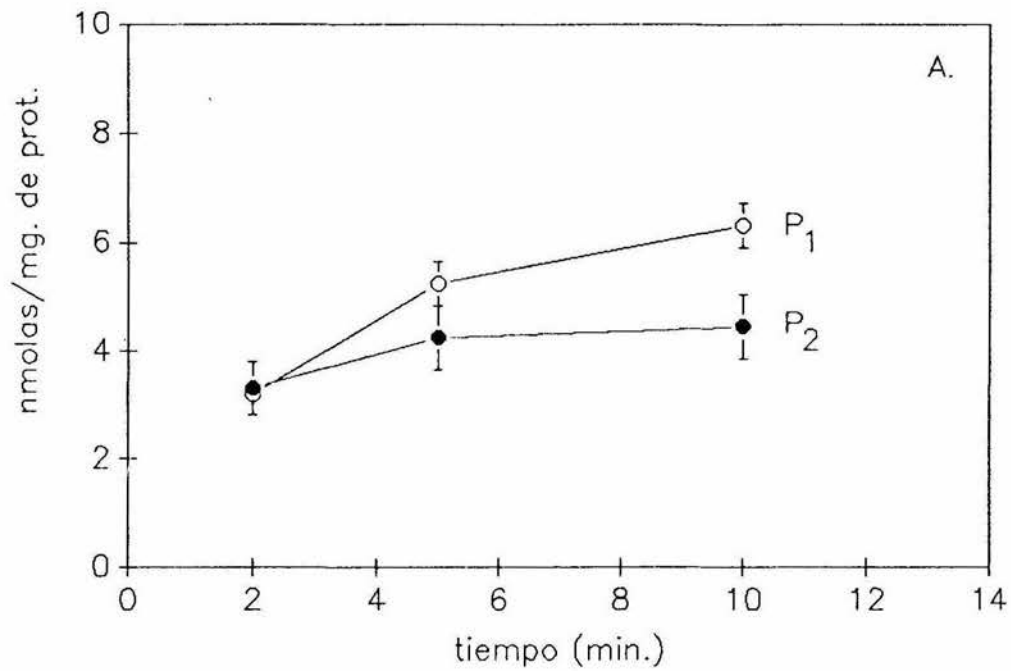
EFEECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE
LA ACUMULACION DE D-ASPARTATO-3H EN LA RETINA.

Condiciones de Incubación.	(% de inhibición)	
	Pollo	Rata
4°C	95 ± 0.7*	96 ± 0.2*
Cianuro de potasio (1 mM)	57 ± 1.7*	35 ± 5.0*
Dinitrofenol (1 mM)	48 ± 4.0*	23 ± 5.4
Iodoacetato (1 mM)	80 ± 1.4*	48 ± 4.3*
Ouabaina (0.1 mM)	75 ± 2.4*	42 ± 5.2*
Taurina (1 mM)	20 ± 8.7	26 ± 7.6
GABA (1 mM)	25 ± 7.3	21 ± 9.43
L-α-aminoadípico (1 mM)	12 ± 5.29	16 ± 8.23
Kainato (200 μM)	50 ± 2.0*	16 ± 6.9
L-aspartato (200 μM)	30 ± 2.9*	63 ± 1.5*
L-glutamato (200 μM)	7 ± 0.8	75 ± 1.6*
L-glutamato-hidroxamato (500 μM)	53 ± 1.3*	60 ± 3.8*
L-aspartato-β-hidroxama- to (500 μM)	53 ± 10 *	62 ± 3.8*

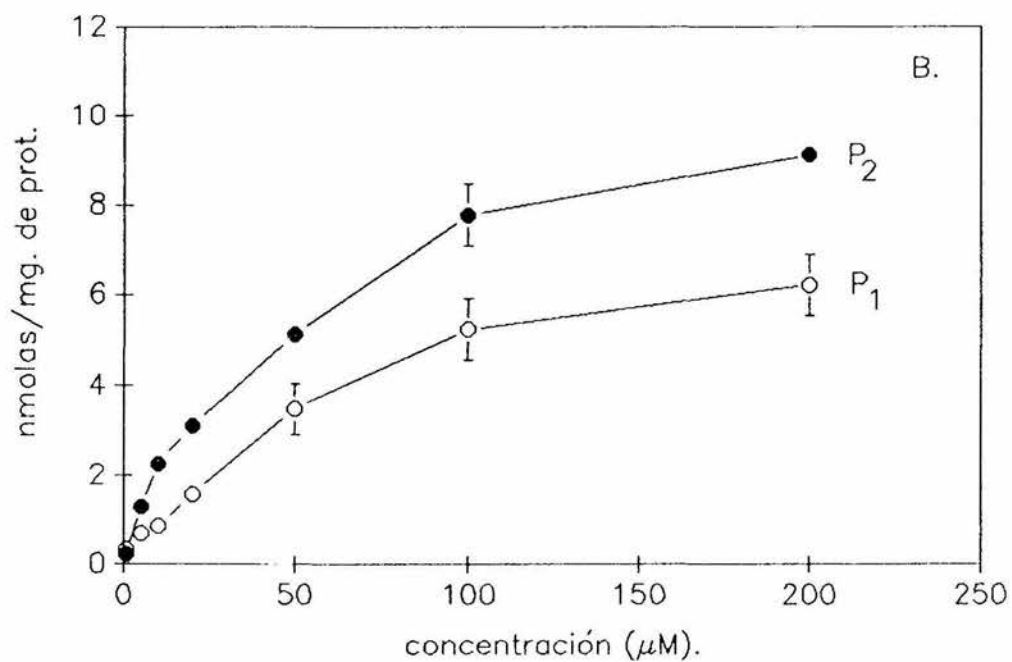
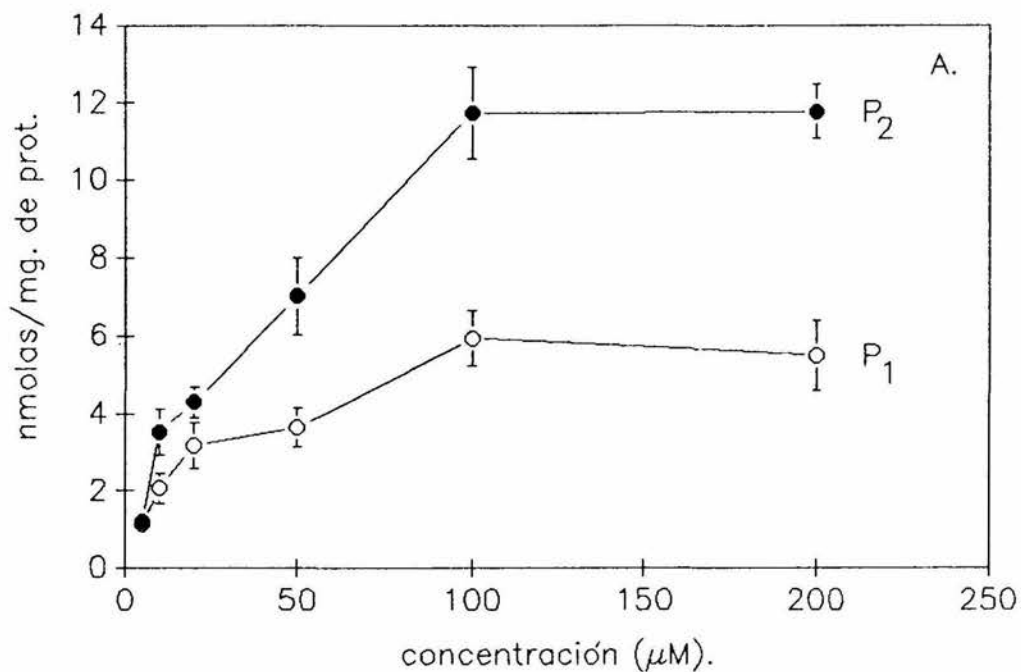
La acumulación de D-aspartato-3H (20 μM) se llevó a cabo a 37°C durante 20 min. Los valores son el promedio de 5 experimentos independientes ± el error estándar. * P<0.05 comparado con el control.



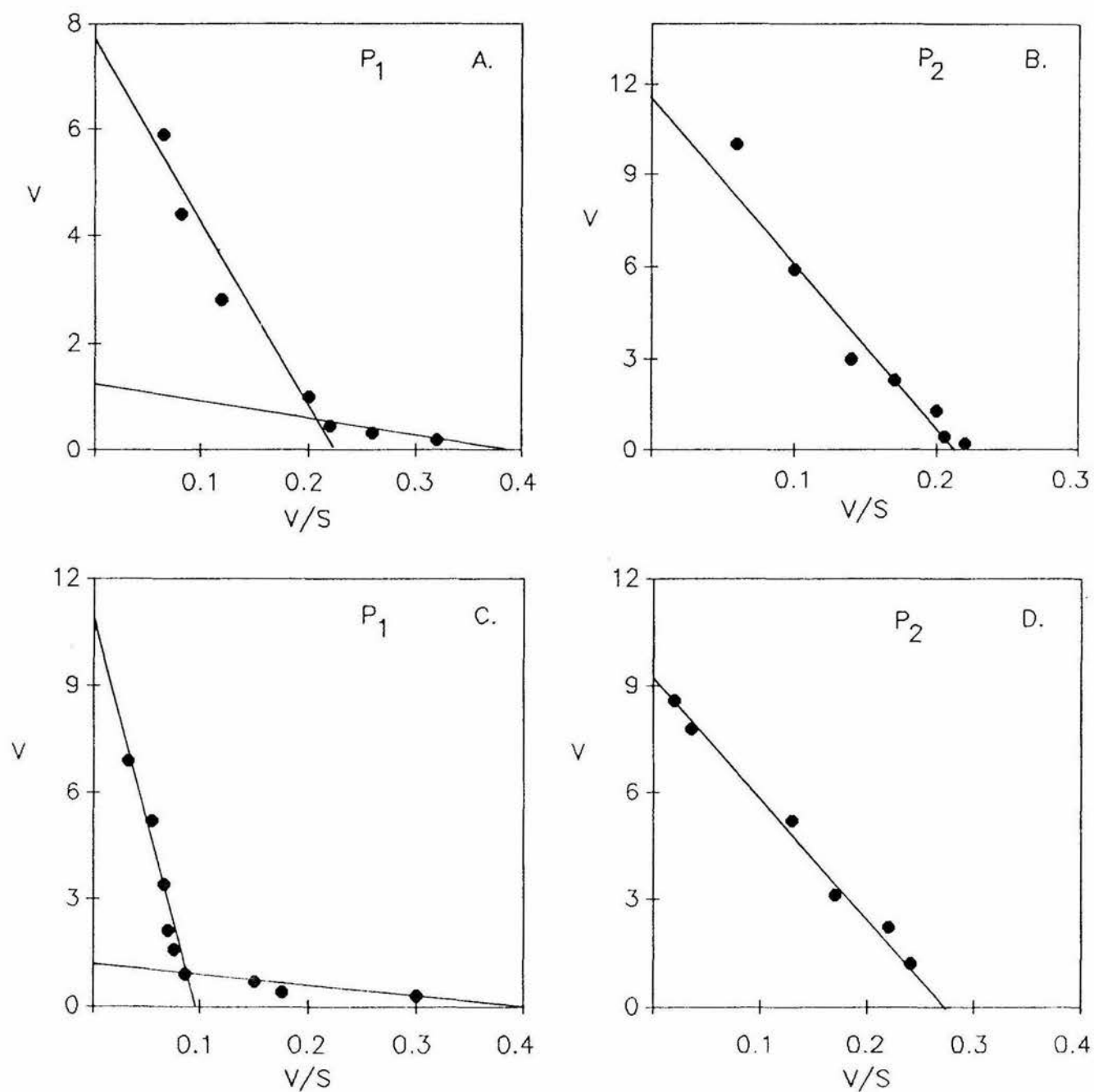
Gráfica 5. Acumulación de D-aspartato-3H (20 μ M) en la retina del pollo y de la rata (B) durante el desarrollo. El sodio se substituyó por cloruro de colina (118 mM). Los datos son el promedio de 5 experimentos independientes \pm el error estándar.



Gráfica 6. Acumulación de L-glutamato-3H (A) y L-aspartato-3H (B) en función del tiempo de incubación en las fracciones sinaptosomales P1 y P2 de la retina del pollo. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes \pm el error estándar.



Gráfica 7. Acumulación de L-glutamato-3H (A) y L-aspartato-3H (B) en presencia de diferentes concentraciones del aminoácido, en las fracciones sinaptosomales P1 y P2 de la retina del pollo. El tiempo de incubación fue de 2 min. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes \pm el error estándar.



Gráfica 8. Gráfica de Eadie-Hufstee de la acumulación de L-glutamato-3H (A y B) y L-aspartato-3H (C y D) en las fracciones sinaptosomales P₁ y P₂ de la retina del pollo. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes.

TABLA 3

EFFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE LA ACUMULACION DE L-GLUTAMATO-3H Y L-ASPARTATO-3H EN LAS FRACCIONES SINAPTOSOMALES P1 Y P2 DE LA RETINA DE POLLO.

Condiciones de Incubación	L-glutamato		L-aspartato	
	(% de inhibición)			
	P1	P2	P1	P2
4°C	66*	3*	50*	69*
Cianuro de potasio (1 mM)	0	0	0	0
Iodoacetato (1 mM)	52*	2	40*	17
Ouabaina (0.1 mM)	48*	2	30*	42*
Sin scdio (0 mM)	86*	85*	77*	78*
L- α -aminoadípico (1 mM)	14	6	15	13
L-aspartato (200 μ M)	80*	69*		
L-glutamato (200 μ M)			63*	68*
D-aspartato (200 μ M)	54*	42*	0	0
L-glutamato-hidroxiato (500 μ M)	13	9	20	30
L-aspartato- β -hidroxiato (500 μ M)	66*	55*	75*	75*

La acumulación de L-glutamato-3H y L-aspartato-3H en las fracciones sinaptosomales P1 y P2 de la retina del pollo se llevó a cabo a 37°C durante 5 min. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes. En todos los casos el error estándar fue menor del 15%. *P<0.05 comparado con el control.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el presente estudio, se encontró que la retina posee la capacidad de acumular glutamato y aspartato a través de un mecanismo de transporte saturable, sensible a la temperatura y dependiente de sodio.

El análisis cinético de la captación del L-glutamato-3H, como del D-aspartato-3H, mostró la presencia de un sólo sistema de transporte con una Km de 100 μ M, en la retina del pollo y de la rata. Estos resultados difieren de los obtenidos por White y Neal (1976), los cuales mostraron en la retina de la rata albina, dos sistemas de transporte, uno de alta afinidad con una Km de 20 μ M y uno de baja afinidad con una Km de 630 μ M.

Nuestros resultados muestran que tanto la captación de L-glutamato-3H como la del D-aspartato-3H en la retina de ambas especies, se inhibe considerablemente en presencia del iodoacetato, lo que apoya la importante actividad glucolítica, de la retina previamente reportada (Graymore, 1970). Sin embargo, en forma diferente, el KCN y el DNP inhibieron considerablemente la acumulación de D-aspartato-3H en la retina del pollo, indicando la importancia de la vía oxidativa. Por otro lado, la inhibición causada por la ouabaina posiblemente esté asociada a la participación de la ATPasa de Na⁺-K⁺ en el mantenimiento del gradiente de sodio, como se ha sugerido para el transporte de varios aminoácidos transmisores (Erenciska, 1989).

La acumulación de L-glutamato-3H y de D-aspartato-3H se inhibió notablemente por los análogos estructurales, L-aspartato y L-aspartato- β -hidroxamato, efecto que se observó en ambas especies, sugiriendo que la especificidad del sistema de

transporte es semejante para estos aminoácidos, resultados que son similares a los encontrados en otros sistemas (Balcar y Johnston, 1972; Drejer, 1982). Por otro lado, el L-glutamato-hidroxamato inhibió de manera importante la acumulación de D-aspartato-3H, mientras que no tuvo efecto sobre la del L-glutamato-3H. El D-aspartato, considerado como inhibidor competitivo del L-glutamato (Balcar y Johnston, 1972; Davies y Johnston, 1976), disminuyó la acumulación de L-glutamato-3H en la retina de la rata, efecto que no se observó en la retina del pollo, datos que sugieren que en la retina del pollo la especificidad del transportador por el D-aspartato es diferente al descrito en otros sistemas.

Resulta interesante que el ácido L- α -aminoadípico, agente gliotóxico (Olney, 1971; Karlsen, 1978), ejerce un pobre efecto inhibitor sobre la captación de L-glutamato-3H en la retina de ambas especies. Indicando que la acumulación de L-glutamato observada, está restringida a las células neuronales.

Por otro lado como era de esperarse el ka que presenta un potente efecto sobre el receptor postsináptico, causó una leve inhibición en la acumulación de L-glutamato-3H en la retina de ambas especies, lo que indica que las propiedades del receptor postsináptico, son diferentes a las del acarreador, resultados que están de acuerdo con estudios realizados tanto en sináptomas y células gliales (Roberts y Watkins, 1975) como en neuronas en cultivo (Drejer, 1982).

La captación del L-glutamato-3 durante el desarrollo de la retina del pollo y de la rata es muy similar a la del D-

aspartato-3H.

En estudios previos se ha reportado que el sistema de transporte de glutamato en neuronas, como en células gliales es dependiente de sodio (Schousboe, 1981). Nuestros resultados en la retina de la rata muestran una dependencia total por éste ión. Dado que la rata es un animal altricial, y su retina se desarrolla después del nacimiento, la dependencia de sodio que se observó desde edades tempranas (5 días), sugiere que el sistema de transporte de este aminoácido se establece desde estadios tempranos del desarrollo, establecimiento que puede estar relacionada con una función trófica (Woodward, 1971), como se ha propuesto para los receptores a aminoácidos excitadores presentes en etapas previas a la formación de la sinápsis (Palmer et al. 1990). Las variaciones observadas en la acumulación de L-glutamato-3H, en la retina de pollo durante el desarrollo embrionario, puede ser un reflejo de una función trófica de éste aminoácido en los distintos estadios, o bien al establecimiento de sinapsis específicas. Resultados similares se han reportado para otros neurotransmisores. Es interesante notar, que el cerebro (Levi, 1972) y la retina (Tunnickliff, 1975), de embriones de pollos tienen la capacidad de transportar GABA por un mecanismo dependiente de sodio, que presenta 2 componentes: uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. Sin embargo este sistema bifásico sólo está presente en animales inmaduros y sólo el de baja afinidad es detectable en el tejido adulto, siendo éste menos dependiente de sodio. Estas observaciones sugieren que los sistemas de captación de aminoácidos neurotransmisores en el pollo, presentan características diferentes a las observadas en

mamíferos.

La gran similitud en las características del sistema de captación del L-glutamato y del D-aspartato y a pesar de algunas diferencias, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el D-aspartato puede ser transportado por el mismo sitio de transporte que el L-glutamato, como se ha reportado en otros sistemas (Balcar y Johnston, 1972). Así, el uso de este compuesto al igual que en otros sistemas ofrece ventajas sobre el L-glutamato, pues se elimina la formación de metabolitos los cuales se ha reportado pueden liberarse por un mecanismo no específico (Drejer, 1983).

La acumulación de L-aspartato-3H en la retina de ambas especies mostró características similares a las del L-glutamato-3H, lo que indica que muy probablemente éste aminoácido también sea transportado por el mismo sistema de transporte.

La actividad del acarreador del L-glutamato-3H y del L-aspartato-3H asociado con las fracciones sinaptosomales P1 y P2 de la retina del pollo, muestra similitudes con los de la retina intacta, tales como saturación y la dependencia de energía. Al igual que en la retina intacta, la acumulación de éstos aminoácidos es inhibida por ouabaina, lo que apoya la dependencia de sodio del sistema. Mientras que en la retina intacta el sistema de transporte de éstos aminoácidos mostró baja afinidad ($100 \mu\text{M}$), en la fracción P1 se encontraron 2 componentes, uno de baja y otro de alta afinidad ($2.5 \mu\text{M}$), sin embargo dado que los sistemas no se evidenciaron con el método de las dobles recíprocas, tal vez se requieren de un análisis más detallado

para definir estas constantes. Es interesante notar que el componente para el L-glutamato-3 de baja afinidad ($29 \mu\text{M}$), es de mayor afinidad que la del L-aspartato-3H ($106 \mu\text{M}$), lo que indica la existencia de diferentes poblaciones del transportador, probablemente localizados en diferentes tipos celulares.

En la fracción P2 el transporte de L-glutamato-3H y de L-aspartato-3H, mostró una afinidad intermedia ($68 \mu\text{M}$ y $35 \mu\text{M}$) con respecto a las observadas en la fracción P1, si bien la afinidad por el L-aspartato fue mayor, lo que probablemente sugiere que en la zona sináptica interna éste aminoácido sea el transmisor de las células bipolares.

La baja afinidad observada en la retina intacta, pudiera representar la acumulación de éstos aminoácidos en las células de Müller, las cuales se ha reportado que acumulan glutamato mediante un mecanismo de homointercambio (Barbour y Attwell, 1988), que no se ha reportado en neuronas (Okamoto y Quastel, 1972); o bien, al difícil acceso de éstos aminoácidos hasta las terminales sinápticas.

Resulta interesante observar que el sistema de transporte del L-aspartato es inhibido por el L-glutamato y de la misma manera el del L-glutamato es inhibido por el L-aspartato; así mismo el L-aspartato- β -hidroxamato inhibe la acumulación de ambos aminoácidos, sugiriendo un sistema de transporte común para éstos aminoácidos. De manera similar en fracciones sinaptosomales de la retina de conejo, el acarreador glutamato/aspartato no muestra preferencia por alguno de estos aminoácidos (Thomas y Redburn, 1978). Por otro lado el D-aspartato causó una inhibición considerable (50%) en la acumulación de L-glutamato-3H en ambas

fracciones sinaptosomales, en contraste con el pobre efecto (25%) encontrado en la retina completa, lo que pudiera deberse a que el D-aspartato ocupe los sitios de transporte del L-glutamato localizados en las terminales sinápticas, sin ocupar otros sitios que pudieran localizarse en los somas neuronales o en las células gliales. El D-aspartato sin embargo, no modifica la captación de L-aspartato-3H en las fracciones sinaptosomales, lo que sugiere que no ocupa sitios específicos del L-aspartato.

En forma similar a lo encontrado en la retina intacta el L-aspartato- β -hidroxamato, causó un decremento considerable en los niveles de L-glutamato-3H y L-aspartato-3H acumulados en ambas fracciones.

Los resultados obtenidos apoyan la idea de que el L-glutamato y el L-aspartato funcionan como neurotransmisores en la retina. Aunque estos aminoácidos pueden ocupar el mismo transportador, éste presenta diferente especificidad dependiendo de la región en que se encuentre, lo que sugiere que existen diferentes transportadores probablemente localizados en distintos tipos celulares. Se requieren posteriores estudios para identificar éstos transportadores en un tipo celular específico, y su participación en la modulación sináptica de la retina.

BIBLIOGRAFIA.

Altschuler, R.A., Mosinger, J. L., Hamirson, G. G. Parakkal, M. M. and Wenthol, R. J. (1982). Aspartate aminotranferase-like immunoreactivity as a marker for aspartate/glutamate in guinea pig photoreceptors. NATURE. (London). 298:637.

Balcar, V. J. and Johnston, G. A. R. (1972). The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. J. NEUROCHEM. 19:2657-2666.

Barbour, B., Brew, H. and Attwell, D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. NATURE. 325(29):433-435.

Brandon, C., Lam, D. M. K. and Wu, J. Y. (1979). The γ -aminobutyric acid system in rabbit retina: Localization by immunocytochemistry and autoradiography. PRO. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 76:3557-3561.

Brown, K. T. (1968). The electroretinogram: It's components and their origins. VISION RES. 8:633-677.

Brunn, G. and Ehinger, B. (1974). Uptake of certain possible neurotransmitters into retinal neurones of some mammals. EXP. EYE RES. 19:435-447.

Cervetto, L. and Macnichel, E. F. (1972). Inactivation of horizontal cells in the turtle retina by glutamate and aspartate. SCIENCE. 178:767

Cervetto, L. and Piccolino, M. (1974). Synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells in the turtle retina. SCIENCE. 198:417

Cohen, A. I. (1978). Retinal Organization and function : Possible roles for taurine. En: Barbeau, A. and Huxtable, R. (Eds.) TAURINE AND NEUROLOGICAL DISORDERS. Raven Press, New York, 249-264.

Coyle, J. T., Biziere, K. and Shwarcz, R. (1978). Neurotoxicity of excitatory amino acids in the neural retina. En: Mcgeer, E. G. et al. KAINIC ACID AS A TOOL IN NEUROBIOLOGY. Raven Press. New York. 177-188 pp.

Dacheux, R. F. and Miller, R. F. (1976). Photoreceptor and bipolar cell transmission in the nudpuppy retina. SCIENCE. 191:963

Davies, L. P. and Johnston, G. A. R. (1976). Uptake and release of D- and L-aspartate by rat brain slices. J. NEUROCHEM. 26:1007-1014.

Dowling, J. E. and Ehinger, B. (1978). The interplexiform

cells system. I. Synapses of the dopaminerg neurons of the goldfish retina. PROC. R. SOC. LOND. [BIOL.]. 201:7-26.

Drejer, J., Larsson, O. M. and Schousboe, A. (1982). Characterization of L-glutamate uptake into and release from astrocytes and neurons cultured from different brain regions. EXP. BRAIN RES. 47:259-269.

Drejer, J., Larsson, O. M. and Schousboe, A. (1983). Characterization of uptake and release processes for D- and L-aspartate in primary cultures of astrocytes and cerebellar granule cells. NEUROCHEMICAL RESEARCH. 8(2):231-243.

Ehinger, B. and Falck, B. (1969): Morphological and pharmacohistochemical characteristics of adrenergic retinal neurons of some mammals. ALBRECHT VON GRAEJES ARCH; KLIN OPHTHALMOL. 178:295-305.

Ehinger, B. and Floren, I. (1978). Indolamine-accumulating in neurons in the retina of rabbit, cat and goldfish. CELL TISSUE RES. 175:37-48.

Ehinger, B. (1981). [3H]-D-aspartate accumulation in the retina of pigeon, guinea pig and rabbit. EXP. EYE RES. 33:381-391.

Erenciska, M. (1989). Stimulation of the Na⁺/K⁺ pump activity during electrogenic uptake of acidic amino acid transmitters by rat brain synaptosomes. J. NEUROCHEM. 52(1):135-139.

Fammiglietti, E. V. and Kolb, H. (1976). Structural basis for on and off center responses in retina ganglion. SCIENCES. 194:193

Farber, D. and Adler, R. (1986). Issues and questions in cell biology of the retina. In: Adler, R. and Farber, D. (Eds.) THE RETINA Parte I. Academic Press Florida, 2-16 pp.

Fesenko, E., Kolesnikow, S. and Lyubarski, A. (19986). Direct action of cGMP on the conductance of retinal rod plasma membrane. BIOCHIM. BIPHIS. ACTA. 856:661-671.

Fricke, U. (1975). Tritosol: a new scintillation cocktail based on triton X-100. ANAL. BIOCHEMISTRY. 63:481-485.

Fung, S. C., Kong, Y. C. and Lam, D. M. K. (1982). Prenatal development of GABAergic, glycinergic and dopaminergic neurons in the rabbit retina. J. NEUROSCI. 2:1623-1632.

Furakawa, T. and Hanawa, I. (1955). Effects of some common cations on electroretinograms of toad. JPN. J. PHYSIOL. 5:289

Graham, L. T., Jr. (1974). Comparative aspects of neurotransmitters in the retina. In: Davson, H. and Graham, L. T. Jr. (Eds.). THE EYE. Academic Press., New York, 283 pp.

Graham, L. T., Jr. Baxter, C. F. and Lolley, R. N. (1970). In vivo influence of light and darkness on the GABA system in the retina of the frog (*Rana pipiens*). BRAIN RES. 20:379-388.

Graymore, C. (1970). Biochemistry of the retina. In: Graymore (Eds). BIOCHEMISTRY OF THE EYE. Academic Press., Inc. London. 645-735 pp.

Grun, G. (1982). THE DEVELOPMENT OF THE VERTEBRATE RETINA: COMPARTIVE SURVEY. Springer-verlug, Berlin. 198-215 pp.

Hertz, L. (1976). Potassium effects on transport of amino acids, inorganic ions and mater; Ontogenic and quantitative differences In: Levile, Battstin, L. and Lajtha, A. (Eds.). TRANSPORT PHENOMENA IN THE NERVOUS SYSTEM. PHYSIOLOGICAL AND ASPECTS PATHOLOGICAL. Adv. Exp. Med. Biol. 69:371-383.

Ikeda, H. and Sheardown, M. J. (1982). Aspartate may be an excitatory transmitter mediating visual excitation of sustained but not transient cells in the cat retina: Iontoforetic studies @in vivo. NEUROSCI. 7:25-36.

Karlsen, L. (1978). The toxic effect of sodium glutamate and D,L- α -aminoadipic acid on rat retina: Changes in high affinity uptake of putative transmitters. J. NEUROCHEM.

Kennedy. A. J. and Voaden, M. J. (1974). Distribution of free amino acids in the frog retina. BIOCHEM. SOC. TRANS. 2:1256-1258.

Kennedy, A. J., Neal, M. J. and Lolley, R. N. (1977). The distribution of amino acids within the rat retina. J. NEUROCHEM. 29:157-159.

Kramer, S. G. (1976). Dopamine in retinal neurotransmission: In: Bonting, S. L. (Eds.) TRANSMITTERS IN THE VISUAL PROCESS, Pergamont Press. Oxford. 165-198 pp.

Levi, G. and Raiteri, M. (1972). Detectability of high and low affinity uptake systems for GABA and glutamate in rat brain slices and synaptosomes. ARCHS. BIOCHEM. BIOPHYS. 151:8-21.

Li, H. B., Marshak, D. W., Dowling, J. E. and Lam, D. M. K. (1986). Colocalization of immunoreactive substance P and neurotensin in amacrine cells of the goldfish retina. BRAIN RES. 366:307-313.

Lopez-colome, A. M. (1981). High-affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. NEUROCHEM. RES. 6:1019-1033.

Lopez-Colome, A. M. and Somohano, F. (1982). Characterization of [L-3H] Aspartate binding to chick retinal subcellular fractions. VISION RES. 22:1445-1501.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randed, R. J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. BIOL. CHEM. 193:265-275.

Lowry, O. H., Roberts, N. R. and Lewis, C. (1956). The quantitative histochemistry of the retina. J. BIOL. CHEM. 220:879-892.

Macaione, S., Ruggeri, P., Dulca, F. and Tucci, G. (1974). Free amino acids in the developing rat retina. J. NEUROCHEM. 27:1411-1415.

Marc, R. E., Lam, D. M. K. and Stell, W. L. (1979). Glycinergic pathways in the goldfish retina. INVEST. OPHTHALMOL. VIS. SCI. [Suppl.] 18:34.

Marc, R. E. and Lam, D. M. K. (1981). Uptake of aspartic and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 78:435-447.

Marc, R. E. (1986). The development of retinal networks. In: Adler, R. and Farber, D. (Eds.). THE RETINA A MODEL FOR CELL BIOLOGY STUDIES PARTE I. Academic Press., Inc. Orlando. 17-65 pp.

Martin, J. H. (1989). Development as a guide to the regional anatomy of the brain. In: Kandel, E. R. (Eds.) PRINCIPLES OF NEURONAL SCIENCE 2a ed. Elsevier Oxford 244-258.

Meller, K. (1984). Morphological studies on the development of the retina. In: Osborne, N. and Chader, G. (Eds.) PROGRESS IN RETINAL RESEARCH. Pergamon Press, London, 3:1-19 pp.

Miller, R. F., Slaughter, M. M. and Massey, S. C. (1982). Light and dark-dependent release of glutamate and aspartate in the isolated retina of the mudpuppy. SOC. NEUROSCI. ABSTR. 8:131

Miller, R. F. and Schwarz, E. A. (1983). Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina. J. PHYSIOL. (LONDON). 334:325

Morgan, I. J. and Inghan, C. A. (1981). Kainic acid effects both layer of chicken retina. NEUROSCI. LETT. 21:275-280.

Morjaria, B. and Voaden, M. J. (1979). The formation of glutamate, aspartate and GABA in the rat retina: glucose and glutamine as precursors. J. NEUROCHEM. 33:541-551.

Mudler, A. H. and Snyder, S. H. (1974). Potassium-induced release of γ -aminobutyric acid (GABA) in slices of substantia nigra of rat. BRAIN RES. 76:297-308.

Murakami, M., Ohtsu, K. and Ohtsuka, T. (1972). Effects of

chemical on receptors and horizontal cells in the retina, J. PHYSIOL. (LONDON). 227:899.

Murakami, M., Ohtsuka, K. and Shimasaki, H. (1975). Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cell in the carp retina. VISION RES. 15:456.

Murakami, M., Shimoda, Y. and Nakatani, K., (1978). Effects of GABA on neuronal activities in the distal retina of the carp. SENSORY PROC. 2:334-338.

Nakatani, K. and Yau, K. (1985). cGMP open the light-sensitive conductance R in the retinal rods. BIOPHYS J. 47:356.

Neal, M. J. and White, R. D. (1971). Uptake of ¹⁴C-L-glutamate by rat retina. BR. J. PHARMACOL. 43:442-443.

Neal, M. J., Peacock, D. G. and White, R. D. (1973). Kinetic analysis of amino acids uptake by rat retina in vitro. BR. J. PHARMACOL. 47:656-657.

Neal, M. J. (1976a). Acetylcholine as a retinal transmitter substance. In: Bonting, S. L. (Eds.) TRANSMITTERS IN THE VISUAL PROCESS. Pergamon Press Oxford. 127-143 pp.

Neal, M. J. (1976b). Minireview: Amino acids transmitters substances in the vertebrate retina. GEN. PHARMACOL. 7:321-332.

Neal, M. J., Collins, G. G. and Massey, S. C. (1982). Inhibition of aspartate release from the retina of the anaesthetised rabbit by stimulation with light flashes. NEUROSCI. LETT. 14:214-245.

Olney, J. W., Ho Ol, Rhee, V. (1971). Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. EXP. BRAIN RES. 14:61-76.

Oraedu, A. C. I., Voaden, M. J. and Marshall, J. (1980). Photochemical damage in the albino rat retina: morphological changes and endogenous amino acids. J. NEUROCHEM. 35:1361.

Okamoto, K. and Quastel, J. H. (1972). BIOCHEM. J. 128:1117-1124.

Palmer, E., Nangel-Taylor, K., Krause, J. D., Roxas, A. and Cotman, C. W. (1990). Changes in excitatory amino acid modulation of phosphoinositide metabolism during development. DEVELOP. BRAIN RES. 51:132-134.

Pasantés-Morales, H, Klethi, J., Ledig, M. and Mandel, P. (1972). Free amino acids of chicken and rat retina. BRAIN RES. 41:494-497.

Quay, W. B. (1965). Retinal and pineal hydroxyindole-O-methyl transferase activity in vertebrates. LIFE SCI. 4:983-991.

Redburn, D. A. and Kyles, C. B. (1980). Localization and characterization of dopamine receptors within two synaptosome fractions of rabbit and bovine retina. *EXP. EYE RES.* 30:699-708.

Roberts, P. J. and Watkins, J. C. (1975). Structural requirements for the inhibition of L-glutamate uptake by glia and nerve endings. *BRAIN RES.* 85:120-125.

Salceda, R. (1989). Uptake and K⁺-stimulated release of [14C]-glycine from frog retinal synaptosomal fractions. *NEUROCHEMICAL RESEARCH.* 14(1):49-54.

Schousboe, A. (1981). Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *INT. REV. NEUROBIOL.* 22:1-45.

Schwartz, E. A. (1982). Identification and function of synaptic transmitters used in the outer synaptic layer of the toad retina. In: Kaneko, A., Tsukahara, N. and Uchizono, K. (Eds.) *NEUROTRANSMITTERS IN THE RETINA AND THE VISUAL CENTERS.* Biomedical Research Foundation Tokyo. 51-59 pp.

Shank, R. P. and Aprison, M. H. (1979). Biochemical aspects of neurotransmitter function of glutamate. In: Filer, L. J., Garattini, S., Kare, M. R., Reynolds, W. A. and Wurtman, R. J. (Eds.) *GLUTAMIC ACID: ADVANCES IN BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY.* Raven Press. New York. 139-150 pp.

Slaughter, M. M. and Miller, R. F. (1983). The role of excitatory amino acid transmitters in the mudpuppy retina: An analysis with kainic acid and N-methyl-D-aspartate. *J. NEUROSCI.* 3:1701.

Starr, M. S. and Voaden, M. J. (1972). The uptake of 14C-amino butyric acid by the isolated retina of the rat. *VISION RES.* 12:1261-1269.

Starr, M. S. (1975). A comparative study of the utilization of glucose, acetate, glutamine and GABA as precursors of amino acids by retina of the rat, frog, rabbit and pigeon. *BIOCHEM. PHARMACOL.*, 24:1193-1197.

Stell, W. K., Ishida, A. T. and Lighfoot, D. O. (1977). Structural basis for on and off-center responses in retinal bipolar cells. *SCIENCE.* 193:1269.

Stone, R. A., Kuwayama, Y. and Laties, A. M. (1987). Regulatory peptides in the eye. *EXPERIENTIA.* 43:791-800.

Sugawara, K. and Nigishi, K. (1973). Effects of some amino acids on the horizontal cells membrane potential in the isolated carp retina. *VISION RES.* 13:977.

Sugiyama, It., Ito, I. and Hinoro, C. (1987). A new type of

receptor linked to inositol phospholipid metabolism. NATURE. 325:531-533.

Thomas, T. N. and Redburn, D. (1978). Uptake of [14C]-aspartic acid and [14C]-glutamic acid by retinal synaptosomal fractions. J. NEUROCH. 31:63-68.

Tunnickliff, G., Firneisz, G., Ngo, T. T. and Martin, R. O. (1975). Developmental changes in the kinetics of γ -amino butyric acid transport by chick retina. J. NEUROCHEM. 25:649-652.

Voaden, M. J. (1974). Light and the spontaneous efflux of radioactive glycine from the frog retina. EXP. EYE RES. 18:467-475.

Voaden, M. J. and Morjaria, B. (1980). The synthesis of neuroactive amino acids from radioactive glucose and glutamina in the rat retina, effects of light stimulation. J. NEUROCHEM. 35:95.

Vogel, Z., Maloney, G. J., Ling, A. and Daniels, M. P. (1977). Identification of synaptic acetylcholine receptor sites in the retina with peroxidase-labeled- α -bungaratoxin. PROC NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 74:3268-3272.

Watt, C. B., Li, H. B. and Lam, D. M. K. (1985). The presence of three neuroactive peptides in the putative glycinergic amacrine cells of an avian retina. BRAIN RES. 348:191-197.

Werman, R. (1966). Criterios for identification of a Central Nervous System transmitter. COMP. BIOCHEM, PHYSIOL. 18:745-766.

White, R. D. and Neal, M. J. (1976). The uptake of L-glutamate by the retina. BRAIN RES. 111:79-93.

Woodward, D. J., Hoffer, B. J., Siggins, G. R. and Bloom, F.E. (1971). The ontogenic development of synaptic activation and responsiveness to neurotransmitter substance in rat cerebellar Purkinje cells. BRAIN RES. 34:73-97.

Wu, S. M., and Dowling, J. C. (1978). L-Aspartate: evidence for a role in cone receptor transmission in the carp retina. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 75:5205.

Yazulla, S. (1983). Stimulation of GABA release from retinal horizontal cells by potassium and acid amino acid agonists. BRAIN RES. 275:61-74.

Yazulla, S. and Kleinschmidt, J. (1983). Carrier mediated release of 3H-GABA from goldfish retinal horizontal cells. BRAIN RES. 263:63-75.