



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE  
GLUTAMATO Y ASPARTATO EN LA RETINA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
**D A N I E L R E Y E S H A R O**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1997.

DIRECCIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCIÓN REGULAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Caracterización de la  
acumulación de glutamato y aspartato en la retina"

realizado por Daniel Reyes Haro

con número de cuenta 9355005-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Rocío Salceda Socanelles

Propietario

Dra. Claudia González Espinosa

Propietario

M. en IBB Saúl Cano Colín

Suplente

Dr. Octavio Quesada García

Suplente

Q. Silvestre Alavez Espidio

*Lucio López A.*  
*1995*  
*Lucio López A.*  
FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mesa

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA



**Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Rocío Salceda Sacanelles, en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M.**

**El estudiante Daniel Reyes Haro tuvo apoyo del Programa de Becas "Iniciación Temprana a la Investigación " (de febrero de 1995 a febrero de 1996), así como del Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (de febrero a octubre de 1997), ambos programas de Fundación U.N.A.M.**

**A mis padres Ing. Daniel Reyes Godina y Sra. Juana Ma. Haro de Reyes.**

**A mis hermanos: Paola Reyes Haro y Alfredo Reyes Haro.**

**A mi abuelita Antonia Valle vda. de Rivera.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

**Hay tantas personas a las que tengo que agradecer, que al momento de escribir estas líneas, deberas que intento no olvidarme de ninguna de ellas. En primer término tengo que agradecer a mis padres por su apoyo incondicional para realizar esta aventura que después de 5 años culmina con mi titulación. En seguida a mis padrinos: Gonzálo y Delia quienes me recibieron cuando vine a radicar a la cd. de México. A la Sra. Ma. del Refugio Sosa quien me asistió durante más de 2 años y quien ahora es mi casera y más que casera, una gran amiga. A todos mis maestros en la Facultad de Ciencias, los buenos y los malos, ya que de todos y cada uno de ellos aprendí. A mis cuates, que son, gracias a Dios muchos y que por no quedar mal con alguno(a) de ellos cometiendo el error de no mencionarlo voy a decirles ¡GRACIAS! A mis compañeros del laboratorio: Gustavo, Víctor, Marisela, Alejandro, Estuardo, Jorge, Raymundo, Nati, Aidé y Carmen. A mis familiares que radican en Estados Unidos. A Mateo, gracias a quien fue posible la edición de los esquemas de esta Tesis, así como a Alejandro quien me ayudo con mis gráficas.**

**A la Dra. Rocío Salceda Sacanelles por su apoyo, confianza, paciencia y comentarios en la realización de este trabajo; aprovecho también, para publicamente hacerme responsable por las canas verdes que le lleguen a salir.**

**A los miembros del jurado: Dra. Claudia González Espinosa, M. en IBB Saúl Cano Colín, Dr. Octavio Quesada y Q. Silvestre Alavez por sus comentarios y correcciones. Finalmente quiero agradecer de manera muy particular a dos grandes amigos, quienes tuvieron que ver de manera directa en la realización de esta tesis (discutiendo, editando, etc.): Estuardo y Jorge, ellos me aguantaron y soportaron en el laboratorio e incluso ¡fuera de él!**

**A todos pues. ¡MUCHAS GRACIAS!**

# INDICE

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
------------------------	----------

## **II. INTRODUCCION**

A. Estructura del ojo.....	3
B. Estructura de la retina.....	3
C. El evento de la fototransducción.....	4
D. Neurotransmisores.....	10
E. Glutamato y Aspartato.....	11
1. Receptores.....	12
2. Transportadores.....	18
F. Antecedentes.....	23

<b>III. OBJETIVO E HIPOTESIS.....</b>	<b>26</b>
---------------------------------------	-----------

<b>IV. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>27</b>
--------------------------------------	-----------

<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
---------------------------	-----------

A. Acumulación de glutamato $H^3$ y aspartato $H^3$ .....	30
B. Liberación de glutamato $H^3$ y aspartato $H^3$ .....	30

<b>VI. DISCUSION.....</b>	<b>38</b>
---------------------------	-----------

<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
-------------------------------	-----------

<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>42</b>
--------------------------------	-----------

## **RESUMEN**

La retina es el órgano fotosensible que cubre el fondo del ojo de los vertebrados, ésta es responsable de la conversión de la luz en señales eléctricas que posteriormente son procesadas en el cerebro. La imagen, por tanto, se forma gracias a la comunicación entre las neuronas de la retina y del cerebro, dicha comunicación se establece a través de las sinapsis químicas (en la que participa un neurotransmisor) y/o eléctricas (en la que hay un flujo de corriente eléctrica). En la retina de los vertebrados se considera al glutamato como el principal neurotransmisor. Así mismo, se considera que el aspartato (que posee una estructura similar al glutamato) ocupa los mismos sitios que dicho neurotransmisor. Tanto el glutamato como el aspartato poseen un sistema de transporte de alta afinidad dependiente de sodio para su remoción del espacio sináptico. Se considera que ambos aminoácidos ocupan el mismo sistema de transporte. En el presente trabajo se estudió el efecto de agonistas y antagonistas de los receptores de glutamato en la acumulación de aspartato y glutamato, en condiciones de luz y oscuridad. Los resultados mostraron que tanto el glutamato como el aspartato se acumulan en mayor proporción en condiciones de luz que de oscuridad. El glutamato se acumuló en mayor proporción que el aspartato, lo contrario aconteció en la liberación, tanto en condiciones de iluminación como de oscuridad. En cuanto a los compuestos empleados, se presentó una inhibición en la acumulación de cada uno de los aminoácidos, en condiciones de iluminación, por cada uno de los siguientes compuestos: ácido kainico (KA), L-2-amino-4-fosfonobutirato (APB), 6-ciano-7-nitroquinoxalín-2,3-diona (CNQX) y DL-2-Amino-5-fosfonovalerato (APV). En la oscuridad dichos compuestos no tuvieron un efecto significativo en la acumulación de alguno de los aminoácidos. Estos datos sugieren que el aspartato ocupa sitios distintos a los del glutamato y podría funcionar como neurotransmisor en la retina de los vertebrados.

## **INTRODUCCION**

Uno de los cinco sentidos de mayor importancia en los vertebrados -incluyendo al ser humano- es el de la visión, gracias al cual nos es posible percibir imágenes de nuestro entorno y responder a las condiciones del medio que cambian constantemente. El cerebro ha desarrollado mecanismos elaborados y eficientes que le permiten analizar las imágenes presentadas a través del ojo y así reconstruir el mundo visual. ¿Qué hace posible que la luz se transduzca en señales que puedan ser procesadas y enviadas al sistema nervioso central (SNC) para obtener lo que conocemos como imagen?

La retina es el órgano fotosensible que cubre el fondo del ojo de los vertebrados, ésta es responsable de la conversión de la luz en señales eléctricas que posteriormente son procesadas en el cerebro. La formación de la imagen, por tanto, es posible gracias a las neuronas de la retina y del cerebro, las cuales se comunican a través de las sinapsis. Las sinapsis pueden ser de tipo eléctrico o químico. En el primer tipo, la transmisión nerviosa se debe al flujo directo de corriente eléctrica desde de la neurona presináptica (que envía el mensaje) a la neurona postsináptica (que recibe el mensaje) mediante uniones comunicantes (uniones de tipo gap o en cierre). La sinapsis química lleva a la liberación de un transmisor de la terminal presináptica hacia el espacio sináptico, desde donde alcanzará a sus receptores de membrana en la neurona postsináptica y se unirá específicamente a ellos.

La retina se proyecta al núcleo geniculado lateral (NGL) y de éste a la corteza visual que se encarga de la percepción de objetos. La retina se conecta además con el colliculus superior que controla el movimiento de los ojos; con el pretectum que controla la abertura de la pupila y con el núcleo supraquiasmático que controla los ritmos diurnos y cambios hormonales del ciclo circádico. Así pues, el procesamiento de la información enviada por la retina es integrada por el NGL. Los axones del NGL se proyectan a la capa IV de la corteza visual primaria. En la corteza visual, las células de cada capa se conectan con otras regiones corticales. Además de esta red de circuitos, las células de la corteza visual se acomodan funcionalmente en sistemas columnares, de orientación específica y de

dominancia ocular. Estas unidades columnares son verdaderos centros de integración de información, misma que transforman y envían a diferentes regiones del cerebro (Salceda, 1995).

#### **ESTRUCTURA DEL OJO**

La retina se encuentra localizada en el fondo del globo ocular, donde es protegida por una capa externa que, en su parte posterior se conoce como esclerótica y en su parte anterior como córnea. En seguida le sigue una capa vascularizada llamada coroides que irriga la parte interior del ojo que se encuentra en contacto directo con el epitelio pigmentario de la retina. En la parte anterior del ojo está el cuerpo ciliar, que es un cuerpo muscular que posiciona al cristalino según las necesidades visuales. El cristalino se encuentra suspendido en la superficie interna del cuerpo ciliado, que se continúa con el iris y cuya función es regular la entrada de luz al ojo además de dividir al ojo en las cámaras anterior y posterior. A la cámara posterior se le conoce como cámara vitrea y está llena de una sustancia viscosa llamada humor vítreo, en tanto que la cámara anterior contiene el humor acuoso. Las dos cámaras se conectan entre sí por la apertura del iris o pupila (Adler y Farber, 1986; ver figura 1).

#### **ESTRUCTURA DE LA RETINA**

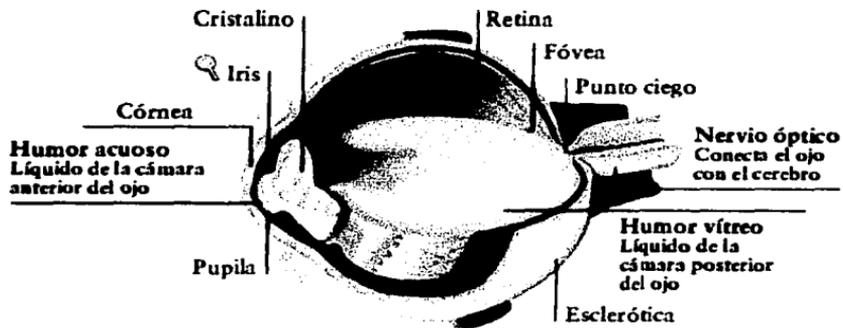
La estructura básica de la retina es laminar y comprende 6 tipos neuronales: fotorreceptores (que comprenden conos y bastones); células horizontales, bipolares, amacrinas, ganglionares e interplexiformes. A la retina se le ha dividido de acuerdo a la organización de estos 6 tipos celulares en 6 capas: la primera y más externa se encuentra en contacto directo con la membrana apical del epitelio pigmentario, formada por los segmentos externos de los fotorreceptores; la segunda es la capa nuclear externa formada por los somas de los fotorreceptores; la tercera contiene a las terminales sinápticas de los fotorreceptores, los que poseen estructuras electrodensas en forma de listón rodeadas por pequeñas vesículas que hacen sinapsis con las células horizontales, las bipolares y las interplexiformes; esta capa se conoce como plexiforme externa; la cuarta capa, la nuclear interna, está constituida por los somas de las células horizontales, bipolares, amacrinas e

interplexiformes; la quinta capa esta formada por la sinapsis entre las células bipolares, amacrinas, interplexiformes y ganglionares y se le conoce como plexiforme interna; la sexta y última capa la constituyen las células ganglionares que se localizan en el margen interno de la retina y cuyos axones dan lugar al nervio óptico (Adler y Farber, 1986).

Las células de Müller constituyen la glía de la retina y con sus proyecciones apicales hacen contacto con los fotorreceptores para formar la membrana limitante externa, mientras que con sus procesos basales forman la membrana limitante interna que aísla a las células ganglionares del cuerpo vítreo. La función de estas células gliales es el control de los niveles extracelulares de iones como el potasio, así como la eliminación del espacio sináptico de los neurotransmisores. (Hertz, 1976; Barbour et al, 1988; ver figura 2).

#### EL EVENTO DE LA FOTOTRANSDUCCION

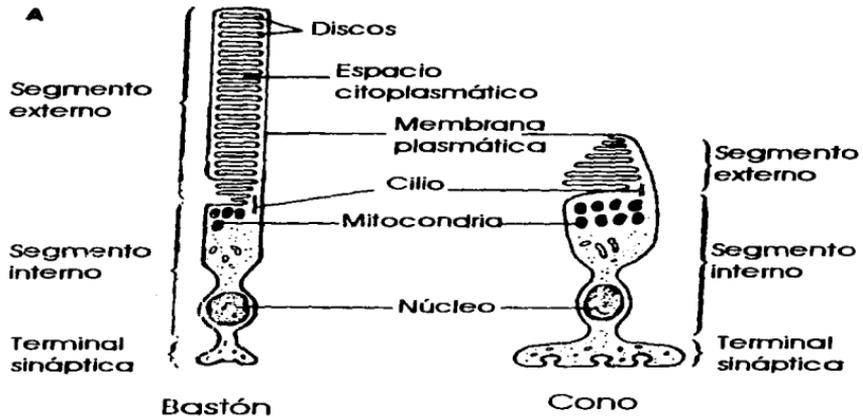
La fototransducción es el evento que consiste en la conversión de un fotón en una señal eléctrica en los fotorreceptores. Estos son neuronas especializadas de forma alargada, orientadas axialmente a la luz incidente, y consisten de un segmento interno y un segmento externo conectados entre si por un cilio inmóvil. El segmento interno contiene los organelos de las células y el extremo proximal se especializa como terminal sináptica a través de la cual transmite información hacia las otras neuronas. El segmento externo de los bastones contiene una serie de membranas aplanadas en forma de sacos cerrados denominados discos (ver figura 3). En las membranas de los discos se encuentra embebida una proteína sensible a la luz, denominada rodopsina, con un máximo de absorción a 500 nm. Cuando la rodopsina absorbe luz, ocurren una serie de cambios en la conformación de la proteína que resultan en la descomposición de la misma en opsina (proteína) y su cromóforo (vitamina A o retinaldehído). La opsina es producida por el fotorreceptor en tanto el retinaldehído se obtiene de la dieta al consumir beta carotenos. La rodopsina es una proteína de membrana que posee 7 asas transmembranales que rodean al cromóforo 11-cis retinal en la bicapa lipídica. El cromóforo aparentemente está de manera horizontal en la membrana y se une a un residuo de lisina en la hélice 7. Cada disco contiene miles de moléculas de pigmento visual.



**Figura 1. Anatomía del ojo de los vertebrados.**



**Figura 2.** Estructura de la retina en capas que inicia con el epitelio pigmentario (EPR) y los segmentos externos de los fotorreceptores (SO). Los tipos neuronales que se disponen en la retina de los vertebrados son los fotorreceptores que comprenden conos (C) y bastones (R), células bipolares (B), células horizontales (H), células amacrinas (Am), células interplexiformes (I), y células ganglionares (G). La glia de la retina está representada por las células de Müller (M) y los astrocitos (As).



**Figura 3. Morfología de los fotorreceptores, tanto los bastones como los conos tienen una estructura similar.**

Con la absorción de un fotón de luz, el retinaldehído se isomeriza a través de varios pasos intermedios de 11-cis a todo trans, ésta forma molecular inicia una serie de cambios conformacionales que culminan con una forma molecular inactiva (pues no es fotoexcitable) de la molécula de rodopsina, la cual posteriormente se regenera a la forma molecular activa (Salceda, 1988). Uno de estos intermediarios es la metarodopsina II que activa a una proteína G: la transducina. La transducina está acoplada a GDP mismo que intercambia por GTP. La proteína G unida al GTP activa una enzima llamada fosfodiesterasa (FDE). La FDE hidroliza el GMPc, los niveles de este nucleótido disminuyen lo que trae como consecuencia el cierre de un canal catiónico (Adler y Farber, 1986; ver figura 4).

En la membrana de los segmentos externos de los fotorreceptores existe un canal catiónico que conduce iones de  $\text{Na}^+$  (aproximadamente 80%) y en menor grado  $\text{Ca}^{++}$  (15%) y  $\text{Mg}^{++}$  (5%) (Yau, 1994); este canal se encuentra abierto en condiciones de oscuridad, por lo que se conoce como corriente oscura de  $\text{Na}^+$ , corriente que mantiene a la célula despolarizada y permite la liberación del transmisor. La apertura de este canal es regulada por el GMPc que al ser hidrolizado por la FDE, en condiciones de iluminación, produce el cierre del canal y por tanto la hiperpolarización del fotorreceptor, lo que trae como consecuencia que la liberación del transmisor se reduzca. (Adler y Farber, 1986).

Una vez que el fotorreceptor libera el transmisor, éste activa receptores postsinápticos de las células bipolares, las cuales fueron caracterizadas inicialmente por Werblin y Dowling en 1969 mediante registros electrofisiológicos en la retina de la carpa, ellos identificaron dos tipos de células bipolares de acuerdo a su respuesta electrofisiológica: células bipolares de tipo ON y células bipolares de tipo OFF. Las primeras se caracterizaban por hiperpolarizarse en la oscuridad en presencia del transmisor, en tanto las últimas se caracterizaban por despolarizarse en la oscuridad en presencia del transmisor. En cuanto a las células ganglionares, éstas habían sido caracterizadas previamente por Hartline en los años treinta, cuando registró la actividad eléctrica de las fibras axónicas de las células ganglionares de la retina de la rana. Hartline en 1938 identificó tres tipos de fibras: fibras ON que respondían a la luz cuando la retina era iluminada, fibras OFF que respondían en la oscuridad y fibras de tipo ON/OFF que respondían a ambos estímulos (iluminación y

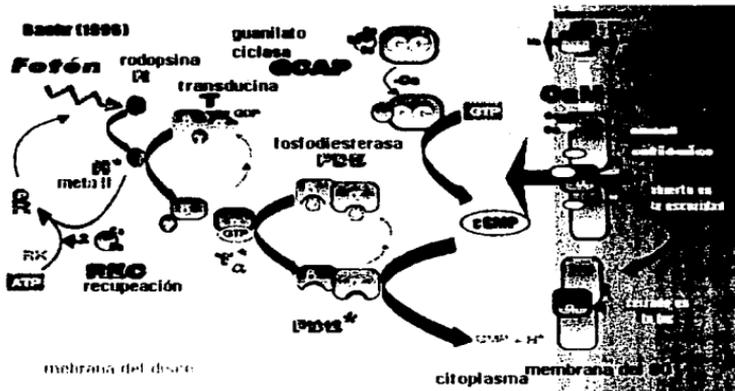


Figura 4. El evento de la fototransducción. En condiciones de luz un fotón actúa sobre la rodopsina cambiando su estructura conformacional, uno de sus intermediarios, la metarodopsina II, activa a la transducina, que intercambia guanósil difosfato (GDP) por guanósil trifosfato (GTP) para activar otra enzima que es la fosfodiesterasa (FDE) que hidroliza GMPc, los niveles de este nucleótido bajan y se produce el cierre de un canal catiónico: el fotorreceptor se hiperpolariza. En la oscuridad la guanilato ciclasa hidroliza GTP a GMPc, éste se acumula en el citoplasma pues la FDE no está activa, y por tanto se abre un canal catiónico: el fotorreceptor se despolariza.

oscuridad). Mediante estudios histológicos en diversas especies de vertebrados (revisado por Wässle y Boycott, 1991) se estableció que las células bipolares ON hacían sinapsis con las células ganglionares del tipo ON ( que respondían fisiológicamente igual que las bipolares ON, se despolarizaban en la luz) y las células bipolares OFF hacían sinapsis con las células ganglionares del tipo OFF (caracterizadas fisiológicamente porque se despolarizaban en la oscuridad).

### NEUROTRANSMISORES

Los neurotransmisores pueden ser de tipo excitatorio o inhibitorio, despolarizando o hiperpolarizando a la célula postsináptica respectivamente. 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 extraejectular.
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.

Varios tipos de neurotransmisores se han identificado en la retina y entre ellos se encuentran aminoácidos, aminas biogénicas y algunos péptidos (Kandel et al., 1991). Entre los aminoácidos que se consideran neurotransmisores están el glutamato y/o el aspartato que son los principales neurotransmisores de tipo excitatorio en la retina de los vertebrados.

## GLUTAMATO Y ASPARTATO

El glutamato y el aspartato son aminoácidos que presentan varias funciones bioquímicas, además de que se incorporan en las proteínas de las células, ambos aminoácidos son productos del ciclo de Krebs y son precursores de otros aminoácidos, por lo que su presencia no es criterio suficiente para considerarlos como neurotransmisores. Adicional a las elevadas concentraciones de estos aminoácidos, su acción sobre las neuronas ha llevado a concluir que funcionan como neurotransmisores en el SNC, incluyendo a la retina (Pasantes- Morales, 1972; Starr, 1975; Macaione, 1974). Así en la retina de la rana, se demostró que el aspartato suprime la onda b del electroretinograma, que corresponde a las células de la capa interna sin, modificar la onda a, que corresponde a la actividad de los fotorreceptores (Furakawa y Hanawa, 1955). Posteriormente mediante técnicas de registro intracelular, se encontró que tanto el glutamato como el aspartato despolarizan a las células horizontales, sin ejercer ningún efecto sobre los fotorreceptores (Cervetto y Macnichel, 1972; Murakami et al., 1972; Sugawara y Negishi, 1973). Con esto se estableció la posibilidad de que dichos aminoácidos pueden funcionar como neurotransmisores de los fotorreceptores. Murakami y colaboradores (1975), demostraron en la retina de la carpa, que tanto el aspartato como el glutamato aplicados exogenamente producen respuestas de polaridad opuesta en células bipolares de tipo ON y OFF caracterizadas fisiológicamente porque las primeras se hiperpolarizan y las últimas se despolarizan con el estímulo luminoso.

La síntesis de glutamato en la retina de los vertebrados y otras partes del SNC ocurre a través de al menos 3 vías que involucran las siguientes enzimas:

La glutamato deshidrogenasa (GDH) que cataliza la formación de glutamato a partir de alfa-cetoglutarato y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ).

La glutaminasa activada por fosfato (PAG) que desamina la glutamina para formar glutamato.

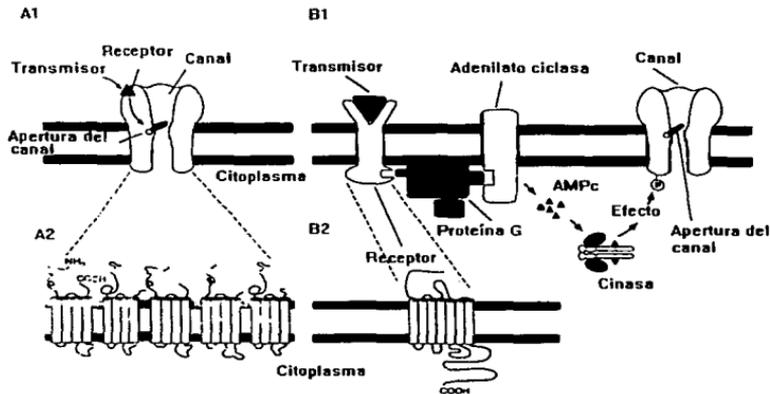
La aspartato amino transferasa (AAT) que se encuentra en neuronas, pero no en glia y cataliza la transaminación entre glutamato/alfa cetoglutarato y aspartato/oxalacetato. Las neuronas tienen un sistema de acumulación de alta afinidad para intermediarios de los

ácidos tricarbóxicos como el alfa-cetoglutarato y el malato, lo que sugiere que la disponibilidad de intermediarios de los ácidos tricarbóxicos puede ser crítica para la formación de glutamato o aspartato (Kalloniatis y Napper, 1996).

## RECEPTORES

Los receptores son proteínas integrales de membrana que funcionan uniéndose a sus ligandos (neurotransmisores) con alta afinidad, la unión del ligando al receptor conlleva a una respuesta específica de la célula. De acuerdo a su mecanismo de acción los receptores se clasifican en ionotrópicos y metabotrópicos (Nakanishi, 1992). Los receptores ionotrópicos activan directamente un canal iónico, mientras que los metabotrópicos están acoplados a la formación de segundos mensajeros que a su vez activan canales iónicos de la membrana (ver figura 5; Kandel et al., 1991).

1) RECEPTORES IONOTRÓPICOS. Los receptores ionotrópicos de glutamato son complejos de subunidades proteicas que al ser activados sufren un cambio conformacional provocando la apertura de un canal iónico. La estructura de estos receptores no está aún esclarecida, pero con base en su caracterización bioquímica, electrofisiológica y molecular, se ha encontrado que tienen similitud a otros miembros de receptores ionotrópicos como el de acetil colina cuya estructura (de 5 subunidades) se conoce gracias a un mapeo de la proteína hecho con análisis cristalográfico de criomágenes (o reconstrucción de hélice por criomágenes) en las membranas postsinápticas del *Torpedo* (Toyoshima y Unwin, 1988; Unwin et al., 1988). Por todo esto se sugiere que los receptores ionotrópicos de glutamato tienen una estructura similar, están compuestos de 5 subunidades, cada subunidad presenta 4 dominios transmembranales, y el segundo segmento transmembranal constituye el canal iónico (Nakanishi, 1992). Estos receptores se han dividido en receptores de tipo NMDA (N-metil-D- aspartato) y de tipo NO NMDA con base en características químicas y electrofisiológicas.



**Figura 5. Receptores ionotrópicos y metabotrópicos**

**A) Los receptores ionotrópicos** al activarse abren directamente un canal iónico que forma parte del receptor (A1). El receptor ionotrópico está formado por 5 subunidades que se arreglan de manera pentagonal en la membrana. Cada subunidad presenta 4 dominios transmembranales, y el segundo segmento transmembranal constituye el canal (A2).

**B) Los receptores metabotrópicos** al recibir a su transmisor activan una ruta de segundos mensajeros, vía una proteína G. La proteína G activa a la adenilato ciclasa, enzima que produce adenosin monofosfato cíclico (AMPc) a partir de adenosin trifosfato (ATP). El AMPc activa a la cinasa de proteína dependiente de AMPc (cinasa) que fosforila un canal iónico (B1). Los receptores metabotrópicos están formados por una cadena polipeptídica que presenta 7 dominios transmembranales (B2). (Tomado de Kandel et al., 1991 y modificado).

**-RECEPTOR NMDA.** Este receptor esta constituido por un complejo proteico, con un peso molecular de 200 KDa, que forma un canal catiónico poco selectivo, altamente permeable a  $Ca^{++}$ , así como al  $Na^{+}$  y  $K^{+}$ .

Al activarse el receptor, los niveles intracelulares de  $Ca^{++}$  se elevan, este incremento se ha relacionado con eventos de plasticidad neuronal y muerte celular (Monaghan et al, 1989). Los principales agonistas de este receptor son el NMDA, el glutamato y el aspartato. En este receptor es posible además reconocer farmacológicamente 5 sitios activos diferentes al sitio de reconocimiento del neurotransmisor, que modulan la actividad del receptor (Barnes y Henley, 1992) y son: el de la glicina, el de antagonistas alostéricos, el de unión del  $Mg^{++}$  dependiente de voltaje, el de unión del  $Zn^{++}$  (Monaghan et al, 1989) y el de unión para las poliaminas (Williams et. al, 1991). Adicionalmente, existen dos sitios distintos de unión en el sitio de reconocimiento del neurotransmisor, uno que une preferentemente agonistas y otro que une preferentemente antagonistas (Monaghan et al, 1989; ver tabla 1).

Gracias al empleo de técnicas de biología molecular ha sido posible clonar dos subunidades del receptor de tipo NMDA (NMDAR1 y NMDAR2) y expresarlos en ovocitos de *Xenopus*.

NMDAR1 posee las propiedades características del receptor como la permeabilidad al  $Ca^{++}$ , el bloqueo por  $Mg^{++}$  dependiente de voltaje, el sitio para la glicina y el efecto de agonistas y antagonistas del receptor. Esta subunidad forma una estructura oligomérica que da lugar a un complejo funcional canal-receptor.

En cuanto a la subunidad NMDAR2, consta de 4 cadenas codificadas por genes diferentes y no presenta una respuesta electrofisiológica apreciable a los agonistas del receptor.

Se piensa así que el receptor es heteromérico, siendo la subunidad NMDAR1 la que le da la actividad al canal, en tanto la subunidad NMDAR2 modula dicha actividad (Nakanishi, 1992). Estudios de hibridación *in situ* demostraron la expresión de NMDAR2 en células ganglionares y amacrinas y en la capa plexiforme interna (Hartveit et al, 1994).

## RECEPTORES NO NMDA

Estos receptores no dependen de voltaje y reconocen de igual manera tanto al glutamato como al aspartato. En cuanto a su peso molecular, es de aproximadamente 100 KDa y presentan 4 dominios transmembranales. Los antagonistas de estos receptores son el CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona) y DNQX (6,7 dinitroquinoxalin- 2,3-diona) (Somohano y López-Colomé, 1990; Bettler y Mulle, 1995). Estos receptores se dividen en receptores de tipo AMPA (ácido propiónico -alfa-amino-3-hidroxi-5metil-4 isoxazol) y receptores de tipo Kainato (KA).

El perfil farmacológico para los receptores de tipo AMPA es distinto al de los receptores de KA. En estudios de unión de radioligandos se observó que el orden de potencia de los agonistas en receptores de KA es KA>Glu>AMPA, en tanto que para los receptores del AMPA es AMPA>Glu>KA (Dingledine y McBain, 1994).

Para los receptores de tipo AMPA se han encontrado 4 genes que codifican para las subunidades GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4 en distintas especies de mamíferos como la rata, el ratón, el ser humano entre otros; en tanto que para los receptores de KA se han encontrado 5 genes que codifican para las subunidades: GluR5, GluR6, GluR7, KA-1 y KA-2 en distintas especies de mamíferos (revisado por Bettler y Mulle, 1995).

En cuanto a las subunidades del receptor de tipo AMPA, se encontró que pueden ensamblarse en configuraciones homoméricas o heteroméricas, siendo sus propiedades funcionales distintas. Esto se aprecia en la subunidad GluR2, que confiere al receptor heteromérico la característica de baja permeabilidad al  $Ca^{++}$  (Hollmann et al, 1991); el resto de las subunidades -GluR1,3 y 4 - son significativamente permeables a  $Ca^{++}$ . La presencia de estas subunidades se ha demostrado en la retina, con técnicas inmunohistoquímicas se encontró una localización celular diferente para cada una de las subunidades ( ver tabla II).

## RECEPTORES METABOTRÓPICOS

Los receptores metabotrópicos de glutamato, constituyen una familia que se caracteriza por estar acoplados a proteínas G.

**TABLA I. SITIOS DEL RECEPTOR NMDA**

Sitio de unión	Características	Observaciones
Glicina	Incrementa la acción de los agonistas de NMDA, no activa por sí sola al receptor.	La estimulación no se inhibe por estricnina(antagonista del receptor de glicina.
Antagonistas alostéricos	Su unión se incrementa con glu y gly. Estos compuestos son: la fenilciclidina y el malato de dizocilpina (MK801)	Se localizan en el lumen del receptor.
Zinc	Bloquea corrientes producidas. No es dependiente de voltaje.	Se ha sugerido que existen 2 sitios de unión para este ión en el canal.
Magnesio	Bloquea corrientes activadas por NMDA	Se une a un sitio interno del canal
Pollamíns	Potencian la unión de antagonistas no competitivos (MK801, TCP) y afectan la unión de glutamato y glicina.	

TABLA II. LOCALIZACION DE LOS RECEPTORES NO NMDA EN LA RETINA

SUBUNIDAD DEL RECEPTOR	TECNICA EMPLEADA PARA SU LOCALIZACION	DISTRIBUCION EN LA RETINA
GluR1	Inmunohistoquímica	Capa plexiforme interna y cuerpos celulares de las amacrinas y ganglionares de la rata (Peng et al., 1995).
GluR2	Inmunohistoquímica	Capa plexiforme externa y células bipolares de la rata; en el pez dorado está en las células bipolares On, incluyendo las dendritas y la terminal sináptica (Peng et al., 1995).
GluR2/3	Inmunohistoquímica	Capa plexiforme interna y externa, así como varios cuerpos celulares de la nuclear interna y la capa ganglionar (Peng et al., 1995).
GluR4	Inmunohistoquímica	En células de Müller (Peng et al., 1995)
GluR5	No está reportado	
GluR6/7	Inmunohistoquímica	En gran parte de la retina: células horizontales, bipolares, amacrinas y ganglionares (Peng et al., 1995).

Su estructura fue deducida con base en su secuencia y estudios de hidrofobicidad en células transfectadas del ovario de hámster chino y consiste de una sola proteína con 7 regiones de alfa hélice expandidas en la membrana (Nakanishi, 1992; ver figura 5). En cuanto a sus mecanismo de transducción, estos receptores son heterogéneos y están acoplados a diversos sistemas de segundos mensajeros que incluyen el incremento de la hidrólisis de fosfoinosítidos, activación de la fosfolipasa D, incremento o reducción en la formación de AMPe que llevan a la modulación de canales iónicos. Estos sistemas de transducción se caracterizaron por medio de estudios de transfección de DNA en el ovario del hámster chino (Aranori and Nakanishi, 1992).

Los receptores metabotrópicos se dividen en tres grupos de acuerdo a la similitud de sus secuencias de aminoácidos, propiedades farmacológicas y mecanismos de transducción; grupo I, grupo II y grupo III (Duvoisin y Ramonell, 1995).

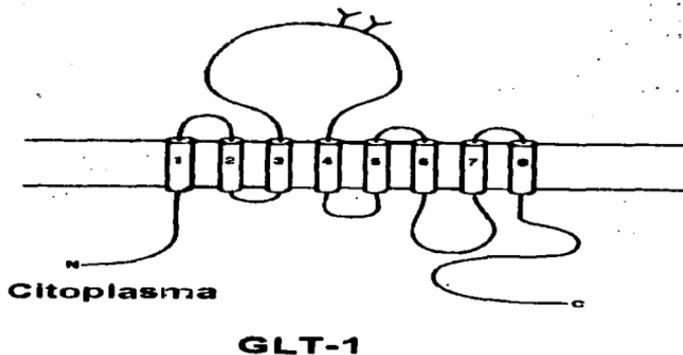
El primer grupo (I) corresponde a los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) mGluR1 y mGluR5 y su agonista más potente es el quisqualato (QQ) y estimulan la hidrólisis de fosfatidilinositol.

Al segundo grupo (II) corresponden los receptores mGluR2 y mGluR3 y sus agonistas más potentes son: el ACPD (1-amino-ciclopentano-1,3-dicarboxilato) y el L-CCG-1 (2S,1'S,2'S)-2-(carboxiciclopropil) glicina e inhiben la acumulación de AMPe estimulada por forskolina.

Al tercer grupo (III) corresponden los receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Su agonista más potente es el APB (L-2-amino-4-fosfonobutirato) que inhibe la producción de AMPe (Brandstätter, et al., 1996). Tanto el grupo III como el II al ser expresados en líneas celulares de fibroblastos transfectados, inhiben la actividad de la adenilato ciclasa, vía una proteína G inhibitoria. (Duvoisin, Zhang, Ramonell, 1995; Petralia et al., 1996). Estos receptores se han localizado con técnicas de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ* en la retina (Tabla III).

#### TRANSPORTADORES

Una vez que el neurotransmisor se une específicamente a su receptor sobre la célula postsináptica, éste debe ser removido del espacio sináptico para terminar su efecto.



**Figura 6. Modelo del transportador glial de glutamato (GLT-1) clonado del cerebro de la rata, que muestra su posible orientación en la membrana plasmática (adaptado de Pines *et al.*, 1992).**

La remoción del neurotransmisor puede llevarse a cabo por difusión, degradación enzimática o acumulación. La difusión puede remover una fracción de todos los componentes del espacio sináptico y no es una vía específica. La degradación enzimática consiste en la conversión del neurotransmisor en compuestos que no son reconocidos por el receptor postsináptico, estos pueden ser o no ser incorporados a la célula por difusión o acumulación. El mecanismo de acumulación del glutamato consiste en la remoción de éste neurotransmisor a través de un sistema de transporte específico de alta afinidad (del orden de micromolar) dependiente de sodio (ver figura 7; Kandel et al., 1991). La caracterización de los sistemas de transporte de aminoácidos se inicia con Christensen en los años 50's y 60's. En el SNC se ha demostrado la función de un sistema de transporte para glutamato y/o aspartato de baja afinidad, este sistema de transporte está asociado a la actividad metabólica de la célula. Adicional a este sistema de transporte, en el SNC se ha identificado un sistema de transporte de alta afinidad dependiente de sodio, que se localiza en las terminales sinápticas. Sin embargo este sistema parece transportar tanto glutamato como aspartato, por lo que existe controversia en cuanto a que si ambos aminoácidos funcionan como neurotransmisores o bien que el aspartato ocupa el sitio del glutamato.

En el proceso de la neurotransmisión glutamatérgica, la remoción del glutamato del espacio sináptico se lleva a cabo por un sistema de transporte de alta afinidad dependiente de  $\text{Na}^+$  (Saleceda y Vilchis, 1994). A la fecha, con técnicas de biología molecular se han clonado 5 transportadores: GLT-1 del cerebro de rata (Kanai y Hediger, 1992), GLAST del cerebro de la rata (Pines et al., 1992a), EAAC1 del intestino delgado de conejo (Pines et al., 1992b), EAAT4 del cerebelo del humano (Fairman et al., 1995) y EAAT5 de la retina del humano (Ariza et al., 1997). Los 5 poseen similitudes en secuencia, aunque tienen diferente distribución y función. La expresión de los 5 transportadores se estudió en la retina (ver tabla IV).

TABLA III. LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES METABOTROPICOS EN LA RETINA

RECEPTOR	TÉCNICA EMPLEADA PARA SU LOC	LOCALIZACIÓN EN LA RETINA
mGluR1	Inmunohistoquímica	En la capa plexiforme interna, colocaliza con el receptor de inositol trifosfato (IP <sub>3</sub> ) (Peng, et. al, 1995). En la capa plexiforme externa en las dendritas de las células bipolares que hacen sinapsis con los fotorreceptores (Koulen et al., 1997)
mGluR2	Hibridación de RNAm	En la parte interna de la capa nuclear interna y algunas ganglionares (Ohishi, et. al. 1993). (Ohishi et al., 1993).
mGluR3		
mGluR4	Hibridación de RNAm	Presenteen cuerpos celulares de células ganglionares (Akazawa et al., 1994).
mGluR5	Inmunohistoquímica.	En la capa plexiforme externa, en células bipolares, en procesos postsinápticos a los fotorreceptores y en la plexiforme interna en las células amacrinas, en los procesos postsinápticos a las células bipolares (Koulen et al., 1997)
mGluR6	Hibridación de RNAm.	En la parte externa de la capa nuclear interna (Akazawa et al., 1994).
mGluR7 y mGluR8 (Duvoisin, 1995)	Hibridación de RNAm.	En la capa nuclear interna y en los cuerpos celulares de las células ganglionares.

TABLA IV. LOCALIZACION DE LOS TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EXCITADORES EN LA RETINA

TRANSPORTADOR	TECNICA EMPLEADA PARA SU LOCALIZACION	LOCALIZACION EN LA RETINA
EAAC1	Hibridación <i>in situ</i> .	En células individuales o grupos de células en la capa ganglionar de la retina; presenta una distribución difusa en la capa ganglionar interna (Kanai et al., 1995).
GLT-1	Inmunocitoquímica	En fotorreceptores, específicamente en conos y en células bipolares en la retina de la rata (Eule, et. al. 1995).
GLAST	Inmunohistoquímica	En las células de Müller, en las sinapsis de los bastones (esférulas), astrocitos y epitelio pigmentario (Devorriche y Raven, 1995).
EAAT4	Clonación y caracterización funcional	Expresión sólo en el cerebelo (Fairman et al., 1995).
EAAT5	Clonación y caracterización funcional	Expresión sólo en retina (Arriza et al., 1997).

Estudios de transporte de glutamato en células de Müller de la retina de la salamandra mostraron una acidificación intracelular y el movimiento de un anión hacia el espacio extracelular (Attwell et al., 1993), el sistema de transporte de alta afinidad dependiente de sodio proporcionó un potencial de membrana de  $-90\text{mV}$ , a este potencial, la estequiometría del transportador de glutamato dependiente de sodio (GLT-1, GLAST y/o EAAC1) se piensa que sería la siguiente: por cada molécula de glutamato entrarían 2 iones de  $\text{Na}^+$  y un protón; al tiempo que saldría un ión de  $\text{K}^+$  y un  $\text{OH}^-$ ; la concentración intracelular y extracelular de glutamato sería de  $10\text{mM}$  y  $0.6$  micromolar respectivamente (Barbour et al., 1988), valores que resultan razonables ya que la concentración de glutamato en el líquido cerebroespinal es de  $1$  micromolar, concentración que se sugiere sea la misma que existe en el espacio extracelular tanto en el cerebro como en la retina (Attwell, 1988). Para que estas concentraciones se mantengan se requiere de transportadores altamente eficaces como el de GLT-1 que tiene una  $K_m$  de  $2$  micromolar para el glutamato.

Estudios inmunohistoquímicos han permitido conocer la localización y distribución en la retina de 4 de los 5 transportadores. EAAC1 en el sistema nervioso es exclusivo de neuronas y en la retina se encuentra en células horizontales, amacrinas y ganglionares (Roulen et al., 1996). GLT-1 se encuentra tanto en neuronas como en la glia, en la retina es el menos abundante de los tres y está en células bipolares y amacrinas (Roulen et al., 1996). GLAST es exclusivo de glia, en la retina es el más abundante y se expresa en células de Müller (Roulen et al., 1996).

Los fotorreceptores no presentan inmunoreactividad a estos tres transportadores lo que sugiere la presencia de otro transportador (Roulen et al., 1996). EAAT4 se ha reportado solo en cerebelo (Fairman et al., 1995). EAAT5 es exclusivo de la retina (Arriza et al., 1997).

En el caso de los dos últimos transportadores (EAAT4 y EAAT5) se ha observado que además de tener las propiedades de un transportador de glutamato dependiente de sodio se activan a través de una corriente de cloro (Fairman, et al., 1995 y Arriza, et al., 1997)

## ANTECEDENTES

Al revisar la fototransducción queda claro que todos los fotorreceptores, sean conos o bastones, se despolarizan en respuesta a la oscuridad, liberando así glutamato. Si continuamos en el descenso de la vía vertical de la retina (fotorreceptor-bipolar-ganglionar) encontramos que al liberarse el glutamato, éste despolariza a las células bipolares OFF e hiperpolariza a las células bipolares ON. El efecto contrario se produce en la luz. De esta manera existen dos vías generales en la transmisión vertical de la retina la vía ON y la vía OFF. En la actualidad se conocen análogos estructurales del glutamato que distinguen entre la vía ON y la OFF, el más conocido es el APB que actúa selectivamente hiperpolarizando a las bipolares ON, en tanto que la vía OFF no se altera (Slaughter y Miller, 1981; Schiller, 1993). El APB actúa en los receptores metabotrópicos de las células bipolares ON cerrando canales iónicos mediante el incremento de la hidrólisis de GiMPc a través de una vía que se asocia con proteínas G (Slaughter y Miller, 1981; Schiller, 1993). El KA, por su parte, despolariza la vía OFF de la retina mediante la activación de receptores ionotrópicos de tipo NO-NMDA.

Aunque se considera al glutamato como el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central, existe controversia en cuanto a que si el aspartato funciona o no como neurotransmisor. Evidencias a favor indican que en la retina la acumulación de aspartato está restringida a ciertos tipos celulares (Lam y Hollyfield, 1980; Brandon y Lam, 1983; Marc et al. 1990).

Así mismo, en la retina de la rata hay una acumulación diferencial de ambos aminoácidos durante el desarrollo. La acumulación de glutamato es más elevada en etapas tempranas del desarrollo (5 días), en tanto que la acumulación de aspartato después del nacimiento es baja pero ésta se incrementa durante la diferenciación de los fotorreceptores, lo que sugiere la existencia de dos sistemas de transporte (Salceda y Vilchis, 1994).

Por otra parte la acumulación de glutamato y aspartato presentan constantes de afinidad similares (100µM), sin embargo el hecho de que el D-aspartato -análogo estructural no metabolizable- inhiba la acumulación de glutamato y no de aspartato, tanto en retina completa como en sinaptosomas de rata, sugiere distintos sitios para el glutamato y para

el aspartato. Los dos aminoácidos podrían ocupar el mismo transportador, presentando diferente especificidad dependiendo de la región donde se encuentren, lo que sugeriría una modulación diferente, o bien distintos transportadores en distintas poblaciones celulares (Salceda y Vilchis, 1994).

La liberación en cierta manera es un reflejo de la acumulación, y si se libera más aminoácido puede ser que se acumule menos y viceversa. En estudios de liberación de aminoácidos excitadores tanto en sinaptosomas como en rebanadas del hipocampo de la rata, se ha encontrado que antagonistas y agonistas del receptor NMDA modifican la liberación de ambos aminoácidos de manera diferencial (Martin et al., 1991). En cuanto a los agonistas y antagonistas del receptor tipo NO-NMDA, también se encontró que tienen efecto en la liberación de aspartato pero no modifican la de glutamato (Martin et al., 1991). Esto sugiere que la activación de receptores ionotrópicos de glutamato puede modular la liberación sináptica de aspartato y de glutamato. Cabe hacer notar que también existe evidencia electrofisiológica (Baskys y Malenka, 1991) y bioquímica (Herrero, 1992; Duncan, 1993) que sugiere que el glutamato regula su propia liberación por medio de autorreceptores mismos que se verían afectados con el uso de análogos estructurales del glutamato y esto de alguna manera podría repercutir en la acumulación.

## **OBJETIVO:**

Dado que no existen a la fecha antagonistas específicos para los 5 transportadores conocidos, y que existe evidencia que indica que antagonistas y agonistas de los receptores de glutamato modifican la liberación de glutamato y aspartato de manera diferente, se decidió probar algunos de los antagonistas y agonistas de los receptores de glutamato, y ver su efecto en la acumulación de glutamato y aspartato, tanto en condiciones de luz como de oscuridad.

## **HIPÓTESIS**

Si el aspartato no funciona como neurotransmisor y ocupa los mismos sitios de transporte que el glutamato, el efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores de glutamato en la acumulación de cada aminoácido debe ser el mismo. Si existe una acumulación diferencial de cada aminoácido será evidencia de que el el aspartato, al igual que el glutamato, podría funcionar como neurotransmisores en la retina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron ratas Long Evans adultas adaptadas a la luz o a la oscuridad. La adaptación a la luz consistió en realizar los experimentos durante el día bajo condiciones de iluminación del laboratorio (lámparas fluorescentes de 75 watts Phillips F96T12/d/XPT). La adaptación a la oscuridad consistió en dejar al animal en un cuarto oscuro (sin ningún tipo de iluminación) durante un mínimo de dos horas, para posteriormente realizar los experimentos bajo iluminación roja tenue (lámpara con un foco rojo de 10 watts Phillips). Los animales se sacrificaron por decapitación (en alguna de las condiciones anteriormente mencionadas). se extrajeron los ojos y se diseccionaron las retinas en Ringer Krebs Bicarbonato (RKB) con una composición milimolar de NaCl 118; KCl 4.7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.17;  $\text{CaCl}_2$  2.5;  $\text{MgSO}_4$  1.17; glucosa 5.6;  $\text{NaHCO}_3$  25 a un pH de 7.4.

Acumulación de glutamato y aspartato. Las retinas se incubaron a 37°C en Ringer Krebs Bicarbonato (RKB) en presencia de 0.25  $\mu\text{Ci}$  de glutamato  $\text{H}^3$  o aspartato  $\text{H}^3$  a una concentración final de 20  $\mu\text{M}$ . Al finalizar la incubación, las retinas se lavaron rápidamente en RKB con el objeto de eliminar la radiactividad no incorporada. El tejido se solubilizó con 0.5ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% a 40°C y la radiactividad acumulada se determinó en un contador de centelleo líquido (Salceda y Vilchis, 1994). El efecto de agonistas y antagonistas del receptor de glutamato sobre la acumulación de aspartato o glutamato se estudió adicionando dichos compuestos al mismo tiempo que el aminoácido radiactivo. Los agonistas empleados fueron el KA que activa receptores del tipo NO-NMDA, el APB que activa receptores metabotrópicos del grupo III, en cuanto a los antagonistas empleados son el CNQX que inhibe la activación de los receptores de tipo NO-NMDA y el DL-2-Amino-5-fosfonovalerato (APV) que inhibe la activación de los receptores de tipo NMDA (ver tabla V).

**Tabla V. Agonistas y antagonistas de los receptores de glutamato y sus constantes cinéticas de inhibición.**

Com-puesto	Efecto o Acción en los receptores de glutamato	Constantes cinéticas de inhibición (CCI)	Organismo en el que se obtuvo la CCI
KA	agonista de los receptores tipo NO-NMDA	Ic50=0.0045 $\mu$ M	en membranas sinaptosomales de corteza cerebral de rata (Honoré et al.,1988).
APB	agonista de los receptores metabotrópicos del grupo III	Ec50= 0.9 $\mu$ M	en células transfectadas del ovario del hámster chino (Nakajima et al., 1993)
CNQX	antagonista de los receptores tipo NO-NMDA	Ic50=1.5 $\mu$ M	en membranas sinaptosomales de corteza cerebral de rata (Honoré et al.,1988).
APV	antagonista de los receptores tipo NMDA.	Ki=1.8 $\mu$ M	en membranas sinaptosomales del cerebro de la rata (Monaghan y Cotman, 1986)

Liberación de glutamato y aspartato. Una vez acumulado el aminoácido radiactivo, como se describe arriba, las retinas se incubaron en 1ml de RKB por 5 periodos sucesivos de dos minutos cada uno. Al finalizar esta incubación se solubilizó el tejido, la radiactividad incorporada en la retina más la suma de la radiactividad liberada en el medio durante la incubación representó el 100% de radiactividad acumulada y se determinó en un contador de centelleo líquido.

Cromatografía en capa fina. La cantidad de glutamato- $H^3$  y aspartato  $H^3$  que permanece como tal en el tejido después de la acumulación se determinó por cromatografía en capa fina (Salceda y Vilchis, 1994). El tejido se homogenizó en etanol al 80% y las proteínas se sedimentaron por centrifugación; alícuotas del sobrenadante se aplicaron sobre la placa de sílica. El cromatograma se desarrolló en una mezcla de etanol/agua/butanol; 7:3:1. Posteriormente la radiactividad se determinó en las fracciones del cromatograma y los aminoácidos se identificaron con los estándares correspondientes revelando con ninhidrina.

Los resultados obtenidos indican que entre el 60 y 70% del aminoácido radiactivo se conserva como tal en el tejido después de los 20 minutos de acumulación.

## RESULTADOS

### -ACUMULACION DE GLUTAMATO Y ASPARTATO

Los estudios de acumulación de glutamato y aspartato en la retina de la rata, en condiciones de luz y oscuridad, indicaron que el glutamato se acumula en mayor proporción que el aspartato en ambas condiciones, lo que apoya la idea de que el glutamato sea el principal neurotransmisor en la vía vertical de la retina de los vertebrados. Así mismo la acumulación de glutamato y/o aspartato es mayor en la luz que en la oscuridad (ver figura 7. tablas VI y VII), lo que concuerda con el hecho de que en la oscuridad se libera más neurotransmisor que en la luz.

Cuando las retinas se incubaron en condiciones de iluminación normal del laboratorio el KA, APB, CNQX y APV inhibieron en 45%-50% la acumulación de glutamato y la de aspartato en un 37-52% respectivamente lo que indicó que el efecto inhibitorio de los compuestos en términos generales fue el mismo (ver tabla VI y figura 8). Al parecer la vía ON de la retina en presencia de estos compuestos se inhibió y la que estaría funcionando sería la vía OFF, ya que los valores de acumulación son muy similares a los del control en la oscuridad (ver tabla VI).

En condiciones de oscuridad ninguno de los 4 compuestos inhibió significativamente la acumulación de glutamato y/o de aspartato, lo que sugiere que la vía OFF sigue funcionando de manera similar al control (ver tabla VII y figura 9).

### LIBERACION DE GLUTAMATO Y ASPARTATO

La liberación de glutamato tras 10 minutos de incubación fue de 30% aproximadamente en condiciones de luz, mientras que en la oscuridad fue de 35% aproximadamente (ver figura 10). El aspartato por su parte presentó una liberación mayor que la del glutamato: 65% aproximadamente en condiciones de luz y 70% en condiciones de oscuridad. Estos resultados concuerdan con los datos de acumulación, ya que el aspartato se acumula menos pero se libera más que el glutamato (ver figura 11).

**Tabla VI. Acumulación de glutamato H<sup>3</sup> y aspartato H<sup>3</sup> en condiciones de luz.**

<b>GLUTAMATO</b>	<b>nmol/g de tejido</b>	<b>% de acumulación</b>	<b>no. de datos</b>
<b>Control</b>	54.46±5.15	100%±9.45%	12
<b>KA (30µM)</b>	29.38±5.73	53.94%±10.52% *	3
<b>APB (50µM)</b>	25.25±3.82	46.36%±7.01% *	3
<b>CNQX (30µM)</b>	28.59±2.52	52.49%±4.62% *	6
<b>APV (100µM)</b>	30.5±1.5	56.00%±2.75% *	3

<b>ASPARTATO</b>	<b>nmol/g de tejido</b>	<b>% de acumulación</b>	<b>no. de datos</b>
<b>Control</b>	17.06±1.53	100%±8.96%	12
<b>KA (30µM)</b>	12.32±2.28	72.21%±13.36%	3
<b>APB (30µM)</b>	10.72±3.11	62.83%±18.22%	3
<b>CNQX (30µM)</b>	8.47±1.06	49.64%±6.21% *	5
<b>APV (100µM)</b>	8.80±0.23	51.58%±1.34% *	3

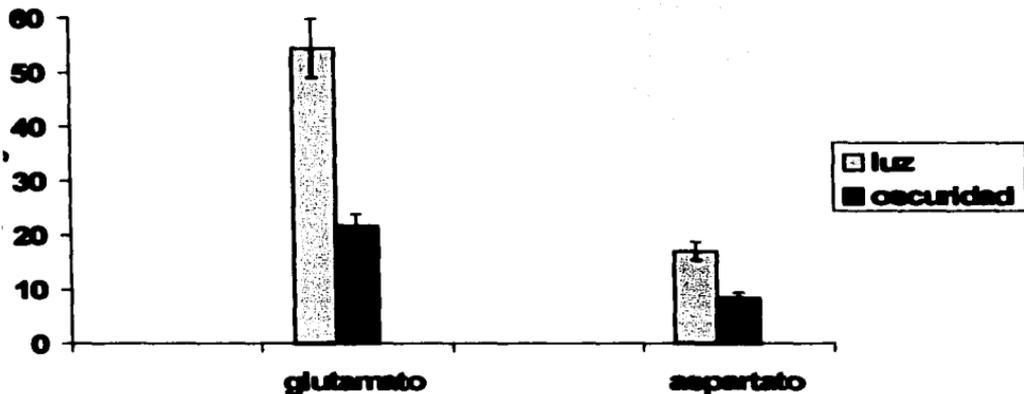
La acumulación de glutamato H<sup>3</sup> y aspartato H<sup>3</sup> (20µM) se llevó a cabo a 37°C durante 20 min. en condiciones de iluminación. Los valores son el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± el error estándar. \*P<0.05 comparado con el control.

**Tabla VII. Valores de la acumulación de glutamato H<sup>3</sup> y de aspartato H<sup>3</sup> en condiciones de oscuridad.**

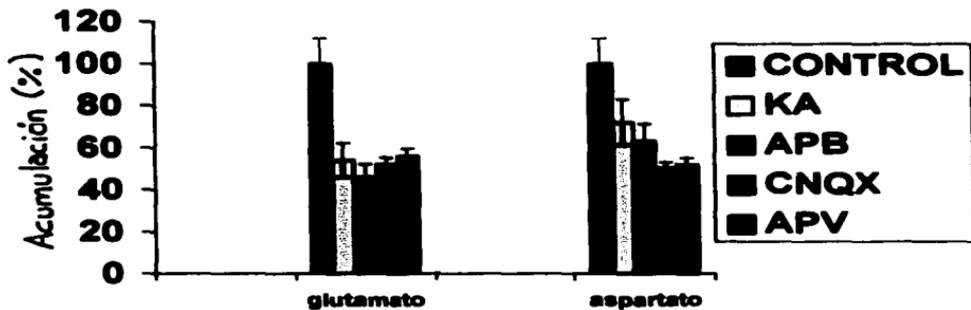
<b>GLUTAMATO</b>	nmol/g de tejido	% de acumulación	no. de datos
Control	21.71±1.65	100%±7.60%	12
KA (30μM)	19.13±3.61	88.11%±16.62%	4
APB (30μM)	14.01±2.92	64.53%±13.45%	3
CNQX (30μM)	19.59±4.15	90.23%±19.11%	3
APV (100μM)	19.69±2.97	90.69%±13.68%	3

<b>ASPARTATO</b>	nmol/g de tejido	% de acumulación	no. de datos
Control	8.51±1.22	100%±14.33%	12
KA (30μM)	8.78±1.49	103.17%±17.50%	6
APB (30μM)	6.82±0.77	80.14%±9.04%	4
CNQX (30μM)	7.47±0.55	87.77%±6.46%	4
APV (100μM)	6.79±0.64	79.78%±7.52%	3

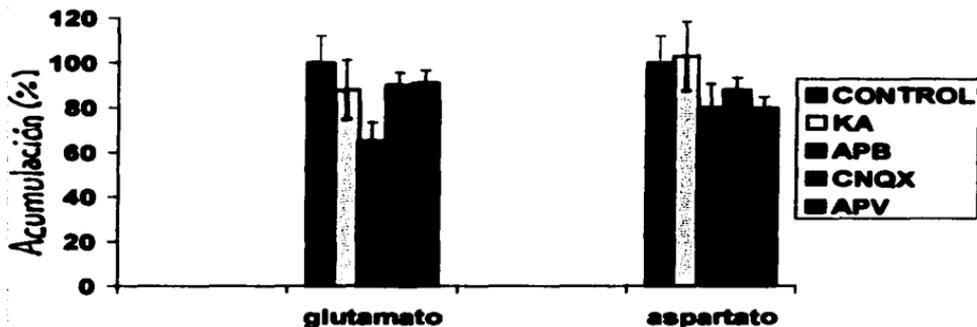
La acumulación de glutamato H<sup>3</sup> y aspartato H<sup>3</sup> (20μM) se llevó a cabo a 37°C durante 20 min. en condiciones de oscuridad. Los valores son el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± el error estándar. \*P<0.05 comparado con el control.



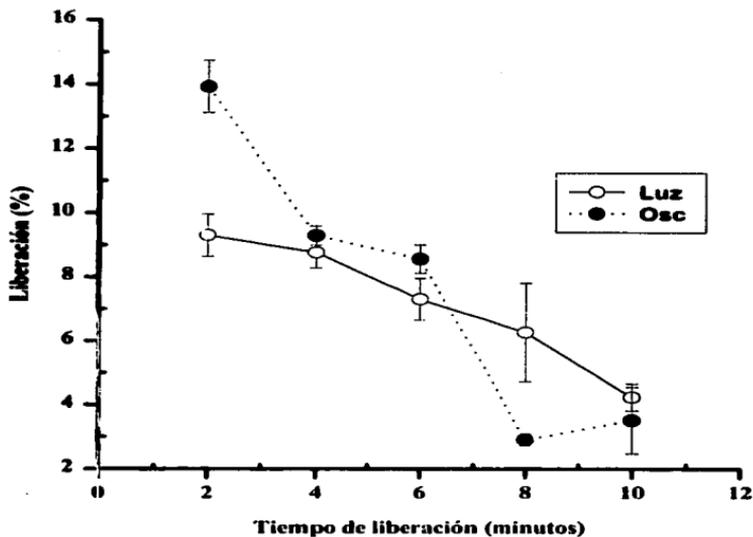
**Figura 7. Acumulación de glutamato  $H^3$  y aspartato  $H^3$  en la retina, durante 20' a 37°C, en condiciones de luz y de oscuridad. Los resultados son el promedio de 12 experimentos independientes  $\pm$  error standar.**



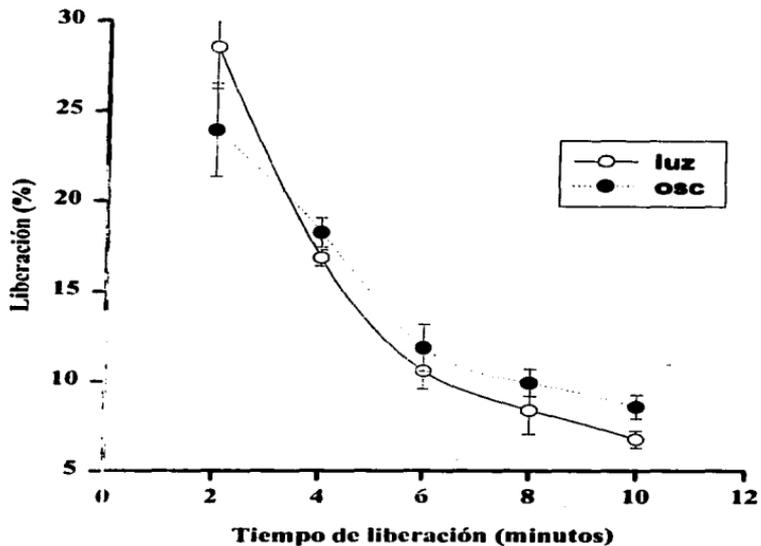
**Figura 8. Acumulación de glutamato H<sup>3</sup> y aspartato H<sup>3</sup> en la retina incubada por 20' a 37°C en presencia de KA (30µM), APB(30µM), CNQX(30µM), y APV(100µM) respectivamente en condiciones de luz. Los valores son el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± el error estándar. \*P<0.05 comparado con el control.**



**Figura 9. Acumulación de glutamato H<sup>3</sup> y aspartato H<sup>3</sup> en la retina incubada por 20' a 37°C en presencia de KA(30μM), APB(30μM), CNQX(30μM), y APV(100μM) respectivamente en condiciones de oscuridad. Los valores son el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± el error estándar. \*P<0.05 comparado con el control.**



**Figura 10. Porcentaje de liberación espontánea del glutamato  $H^+$  durante 10 minutos, a  $37^{\circ}C$  (previa acumulación de  $20''$ ), en condiciones de iluminación y de oscuridad. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  el error estándar.**



**Figura 11. Porcentaje de liberación espontánea de aspartato  $H^3$ , durante 10 minutos, a  $37^\circ C$  (previa acumulación de 20') en condiciones de luz y de oscuridad. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  el error estándar.**

## DISCUSION

La eliminación de los neurotransmisores del espacio sináptico ocurre a través de un sistema de transporte de alta afinidad dependiente de sodio, presente en la terminal presináptica, en la retina de la rata (Vilchis y Salceda, 1991). El sistema de transporte que opera en las neuronas es el primero en actuar en la remoción del neurotransmisor en el espacio sináptico. La presencia de un sistema de transporte de glutamato con un control similar al de las neuronas se reportó en células gliales en cultivo (Burnashev et al., 1992), por lo que la participación de estas células en la eliminación del neurotransmisor no puede descartarse totalmente.

La vía vertical de transmisión sináptica en la retina (fotorreceptor-biopolar-ganglionar) presenta 2 rutas generales: la ON en la que las células bipolares y ganglionares del tipo ON se despolarizan con la luz, y la OFF en la que estas células se despolarizan en la oscuridad. Los fotorreceptores, tanto conos como bastones, se hiperpolarizan en respuesta a la luz, inhibiéndose así la liberación de glutamato y/o aspartato que ocurre en la oscuridad. En términos generales, se asocia la presencia de receptores de tipo NO-NMDA con las células bipolares OFF, en tanto que a las bipolares ON se les asocia con los receptores metabotrópicos de glutamato activados por APB (Nawy y Copenhagen, 1987; Nomura et al., 1994; Shiells y Falk, 1990). Se considera que las células bipolares de conos utilizan mecanismos iónicos distintos a los de las células bipolares de bastones en la respuesta de tipo ON (Hirano y MacLeish, 1991). Saito y colaboradores reportaron que, en la retina de la carpa, los bastones se despolarizaron por la activación de canales de  $\text{Na}^+$  y los conos por canales de  $\text{K}^+$  y/o  $\text{Cl}^-$ . La activación o inhibición de los distintos tipos de receptores de glutamato lleva a cambios en la liberación de este transmisor en la vía vertical de la retina, lo que podría reflejarse en cambios en la acumulación del mismo. Nuestros resultados concuerdan con el hecho de que en la oscuridad se libera más glutamato que en la luz (Miller et al., 1982) ya que la acumulación, tanto de glutamato como de aspartato, es mayor en la luz que en la oscuridad. Por otra parte, la acumulación de glutamato fue mayor que la de aspartato, lo que concuerda con los datos de liberación, ya que el aspartato se libera más que el glutamato. La disminución en la acumulación de

glutamato y aspartato que observamos en presencia de agonistas y antagonistas de los receptores de glutamato, sugiere que la liberación de estos aminoácidos afecta directamente su acumulación. El APB, APV, KA y CNQX inhiben la acumulación de glutamato y aspartato bajo condiciones de iluminación; sin embargo, el APB y el KA inhiben, en mayor grado, la acumulación de glutamato. En la oscuridad el APB inhibió la acumulación de glutamato, en mayor grado, que la de aspartato y el APV la de aspartato, estos resultados sugieren que diferentes poblaciones celulares acumulan glutamato o aspartato.

Existe evidencia de que, tanto los agonistas como los antagonistas de los receptores de tipo NO-NMDA, tienen un efecto inhibitorio o estimulador sobre la liberación de aspartato en sinaptosomas y rebanadas de la corteza cerebral de la rata, sin modificar la liberación de glutamato (Martin et al., 1991). Estos datos sugieren que distintos mecanismos de regulación participan en la liberación de glutamato o aspartato. Los agonistas y antagonistas de los receptores de glutamato empleados en el presente trabajo, afectan de manera diferente la acumulación de glutamato y de aspartato en la retina, lo que sugiere que existe un sistema de transporte que funciona para aspartato, que si es el mismo que el del glutamato, puede tener una modulación diferente y/o estar restringido a una población celular pequeña en la retina.

La inhibición causada por el APB y el KA está de acuerdo con el efecto de estas drogas en los receptores de glutamato en la vía vertical de la retina. La inhibición observada por el APV y el CNQX es sorprendente, ya que era de esperarse que no tuvieran ningún efecto o incluso que incrementaran la acumulación de glutamato y/o aspartato. Adicional al efecto hiperpolarizante en las células bipolares y ganglionares del tipo ON, el APB despolariza a las células horizontales. En presencia de APB en condiciones de iluminación, las vías ON y OFF deben estar inhibidas, lo que daría lugar a una inhibición drástica en la acumulación de glutamato y/o aspartato. Bajo estas condiciones, observamos una acumulación de glutamato y de aspartato similar a los valores de acumulación en la oscuridad, lo que sugiere que el APB hiperpolariza a las células horizontales (Hare et al., 1992) las que a su vez pueden activar a la vía OFF. El KA tuvo un efecto similar al APB sobre la acumulación de glutamato y aspartato en la retina,

inhibición que debe ser causada por la activación directa de los receptores de tipo NO-NMDA. El KA además de activar los receptores de glutamato de la vía OFF de la retina, despolariza a las células horizontales (Lasaster, 1990 y 1991). En condiciones de luz, el KA además de activar la vía OFF podría apagar la vía ON como consecuencia de la despolarización de las células horizontales.

El efecto observado con el APB y el KA también puede ser explicado por la existencia de un transportador de glutamato con un perfil farmacológico semejante al del receptor, éste es, un transportador con un sitio de reconocimiento relacionado con la apertura de un canal de cloro (Grant y Dowling, 1995). Estudios previos de unión específica de glutamato en sinaptosomas de cerebro de rata indicaron que existe una población de receptores dependiente de cloro sensible a APB (Robertis, 1981). Así mismo Zaczek en 1987 encontró que el APB inhibe el transporte de glutamato dependiente de cloro. Sarantis y colaboradores (1988) encontraron que concentraciones de 1 a 100 $\mu$ M de KA producen, al igual que el glutamato, corrientes dependientes de cloro en células fotorreceptoras. Estudios electrofisiológicos demostraron la presencia de un sistema de transporte de glutamato dependiente de cloro en conos (Eliasof y Werblin, 1996; Sarantis, Everett y Atwell, 1988) bastones (Grant y Werblin, 1996) y células bipolares (Grant y Dowling, 1995). Recientemente se clonó en la retina humana a partir de una biblioteca de DNAc de la retina de salamandra un transportador de glutamato acoplado a una corriente de Cl<sup>-</sup> (EAAT5; Arriza et al., 1997). Así mismo, la existencia de autorreceptores que regulan la liberación de glutamato ha sido demostrada en cerebro con técnicas electrofisiológicas (Bhasky y Malenka, 1991) y bioquímicas (Herrero, 1992 y Duncan, 1993). En la retina, la presencia de distintas subunidades de los receptores de glutamato han sido demostradas a nivel presináptico (Peng et al., 1995). La activación de estos autorreceptores se sugiere que induce una corriente de salida de cloro, misma que se ha demostrado en las terminales sinápticas de fotorreceptores (Sarantis, Everet y Atwell, 1988) y de células bipolares (Grant y Dowling, 1995). Esta evidencia apoya la existencia de un transportador de glutamato con características farmacológicas semejantes a las del receptor de glutamato, que puede explicar el efecto inhibitorio del APB, KA, CNQX y APV ya que cada uno de ellos actúa en distintos sitios de la molécula.

## **CONCLUSIONES**

La acumulación de glutamato es mayor que la de aspartato en la retina de la rata, tanto en condiciones de luz como de oscuridad, el efecto contrario se presenta en la liberación, la de aspartato es mayor que la de glutamato en ambas condiciones.

La acumulación de glutamato y aspartato es mayor en condiciones de luz que de oscuridad.

El presente trabajo, de acuerdo a nuestros controles, sugiere que el aspartato no ocupa los mismos sitios que el glutamato y si lo hace existe una modulación distinta para cada aminoácido.

En condiciones de luz, el APB, KA, CNQX y APV inhibieron la acumulación de glutamato y de aspartato. La inhibición puede ser explicada por una despolarización de las células horizontales y/o la presencia de un transportador de glutamato dependiente de cloro que puede ser inhibido por estos análogos.

Los compuestos empleados no resultaron ser una buena herramienta (al menos con esta metodología) para evidenciar diferencias en el sistema de acumulación para glutamato y/o aspartato.

Dado que el aspartato podría funcionar como neurotransmisor en subpoblaciones celulares en la retina, un efecto contrario al que sucede con el glutamato podría presentarse. Posteriores estudios inmunohistoquímicos y/o electrofisiológicos podrían demostrar diferencias en el sistema de acumulación para glutamato y/o aspartato.

## BIBLIOGRAFIA

- Adler R.** y Farber D. 1986. The Retina. A model for cell biology studies. Ed. Academic Press, New York. 363p
- Akazawa C.,** Ohishi H., Nakajima Y., Okamoto N., Shigemoto R., Nakanishi S. and Mizuno N. 1994. Expression of mRNA of L-AP4 sensitive metabotropic glutamate receptors (mGluR4, mGluR6, mGluR7) in the rat retina.
- Aranori I.** and Nakanishi S. 1992. *Neuron* 8:757
- Arriza J.L.,** Eliasof S., Kavanaugh M.P., Amara S.G. 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4155-60.
- Attwell D.,** Barbour B. and Szatkowski M. 1993. Non vesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11:401-407.
- Barbour B.,** Brew H. and Attwell, D. 1988. Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature.* 325(229):433-435.
- Barnes J.M.** y Henley J.M. 1992. Molecular characteristics of excitatory amino acid receptor. *Progress in Neurobiology* 39:113-133
- Baskys A.** and Malenka R.C. 1991. Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 444:687-701.
- Bettler B.** y Muller C. 1995. AMPA and Kainate receptor. *Neuropharmacology* 34(2):123-129.
- Brandon C.** and Lam D.M.K. L-glutamic acid: a neurotransmitter candidate for cone photoreceptors in human and rat retinas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:5117-5121
- Brandstatter J.H.,** Koulen P., Kuhn R., Van der Putten H. and Wässle H. 1996. Compartmental localization of a metabotropic glutamate receptor (mGluR7): two different active sites at a retinal synapse. *J. Neurosci.* 16(15):4749-4756

- Burnashev N., Khodorova A., Jonas P., Helm P.J., Wisden W., Monyer H., Seeburg P.H. y Sakmann B.** 1992. Calcium-permeable AMPA-KA receptor in fusiform cerebellar glial cells. *Science* 256:1566-1570.
- Cervetto, L. and Mac Nichol, E.F.** 1972. Inactivation of horizontal cell in turtle retina by glutamate and aspartate. *Science*, 178, 767-768.
- Derouiche A and Rauen T.** 1995. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamate synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia : evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J. Neurosci. Res.* 42(1):131-143.
- Dingledine R. y Mc Bain C.** 1994. Excitatory amino acid transmitters. Basic Neurochemistry (editado por Siegel, G.J., Agranoff B.W., Albers W.R. y Molinoff P.B.) Raven Press, New York. 367-387.
- Duncan C.P., Zhou M., and Nadler J.V.** 1993. Differential regulation and ion dependence of glutamate and aspartate release from CA1 synaptosomes. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19, 922.
- Duvoisin R.M., Zhang C. and Ramonell K.** 1995. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J. Neurosci.*, 15(4):3075-3083.
- Eliasof S. y Werblin F.S.** 1993. Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander. *J. Neurosci.* 13:402-411.
- Euler T. and Wassle H.** 1995. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 36(3):461-478.
- Fairman W.A., Vandenberg R.J., Arriza J.L., Kavanaugh M.P. and Amara S.G.** 1995. An excitatory amino acid with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375:599-603.
- Furukawa T. and Hanawa Y.** 1955. Effects of some common cations on electroretinograms of toad. *Jpn. J. Physiol.* 5:289.
- Grant G.B. y Dowling J.E.** 1995. A glutamate activated chloride current in cone driven on bipolar cells of the white perch retina. *J. Neurosci.* 15(5):3852-3862.
- Grant G. y Werblin F.S.** 1996. A glutamate elicited chloride current with transporter like properties in rod photoreceptors of the tiger salamander retina. *Vis. Neurosci*

- Hare W.A. and Owen W.G.** 1992. Effects of 2-amino-phosphonobutyric acid on cells in the distal layers of tiger salamanders retina. *J. Physiol-Lond* 445:741-757.
- Hartveit E., Brandstatter J.H., Sassoe-Pognetto M., Laurie D.J., Seeburg P.H. and Wässle H.** 1994. Localization and developmental expression of the NMDA receptor subunit NR2A in the mammalian retina. *J. Comp. Neurol.* 348(4):570-582.
- Herrero I., Miras-Portugal M.T., and Sanchez Prieto J.** 1992. Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. *Nature* 360:163-166.
- Hertz L.** 1976. Potassium effects on transport of amino acids, inorganic ions and mater; Ontogenic and quantitative differences In: Leville, Battstin, L. and Lajtha, A. (eds.). Transport phenomena in the nervous system. Physiological and pathological aspects. *Adv. Exp. Med. Biol.* 69:371-383.
- Hirano y MacLeish.** 1991. Glutamate and 2-amino-4-phosponobutyrate evoke an increase in potassium conductance in retinal bipolar cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:805-809.
- Hollmann M., Hartley M. y Heinemann S.** 1991. Ca<sup>++</sup> permeability of KA-AMPA gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-853.
- Honoré T., Davies S.N., Drejer J., Fletcher E.J., Jacobsen P, Lodge D and Nielsen F.E.** 1988. Quinoxalinediones: potent competitive non- NMDA glutamate receptor antagonists. *Science* 241:701-703.
- Kallionatis M. y Napper B.A.** 1996. Glutamate metabolic pathways in displaced ganglion cells of the chicken retina. *J. Comp. Neurol.* 367:518-536
- Kanai Y. and Hediger MA.** 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360:467-471.
- Kandel E.R., Schwartz J.H. and Jessell T.M.** 1991. Principles of Neuronal Science. Ed. Appleton and Lange, Norwalk Ct 1135p.
- Koulen P., Kuhn R., Wässle H. and Brandstätter J.H.** 1997. Group I Metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5a: localization in both synaptic layers of the rat retina. *J. Neurosci.* 17(6):2200-2211.

- Lam** D.M.K. and **Hollyfield** J.G. 1980. Localization of putative amino acid neurotransmitters in the human retina. *Exp. Eye Res.* 31:729-732.
- Lasaster** E.M. 1990. Properties of non NMDA excitatory amino acid activated channels in isolated retinal horizontal cells. *J. Neurosci* 10(5):1654-1663
- Lasaster** E.M. 1991. Characteristics of single channels activated by QQ and KA in teleost retinal horizontal cells. *Vision Res.* 31(3):413-424.
- 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., **Liu** W.S., **Kallionatis** M., **Raiguél** S.F. and **Van Haesendos**, E. 1990. Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina. *J. Neurosci.* 10(12) :4006-4035.
- Martin** D., **Bustos** G.A., **Bowe** M.A., **Brañy** S.D. and **Nadler** J.V. 1991. Autoreceptor regulation of glutamate and aspartate release from slices of the hippocampal CA1 area. *J. Neurochem.* 56, 1647-1655.
- Miller** R.F., **Schwarz** 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
- Mooaghan** D.T., **Bridges** R.J. y **Cotman** C.W. 1989. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:365-402.
- Murakami** M., **Ohtsu** K., and **Ohtsuka** T. 1972. Effects of chemical on receptors and horizontal cells in the retina. *J. Physiol* 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.
- Nakanishi**, S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:5997-603.
- Nawy** S. and **Copenhagen** DR. 1987. Multiple classes of glutamate receptor on depolarizing bipolar cells in retina. *Nature* 325:56-58
- Nawy** S. and **Jahr** C.E. 1990. Suppression by glutamate of cGMP activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature* 346:269-271.

- Nomura A., Shigemoto R., Nakamura Y., Okamoto N., Mizuno N., Nakanishi S.** 1994. Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77(3):361-369.
- Ohishi H., Shigemoto R., Nakanishi S. and Mizuno N.** 1993. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor mGluR2 in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 53(4):1009-1018.
- Ohishi H., Shigemoto R., Nakanishi S. and Mizuno N.** 1993. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR3) in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 335(2):252-266.
- Pasantes-Morales H., Kleithi J., Ledig M. and Mandel P.** 1972. Free amino acids of chicken and rat retina. *Brain Res.* 51:132-134.
- Peng Y.W., Blackstone C.D., Haganir R.L. and Yau K.W.** 1995. Distribution of glutamate receptor subtypes in the vertebrate retina. *Neuroscience.* 66(2): 483-97.
- Petralia RS., Wang YX., Niedzielski AS. and Wenthold RJ.** 1996. The metabotropic glutamate receptors mGluR2 y mGluR3 show unique postsynap'tic, presynaptic and glial localizations. *Neurosci.* 71(4): 949-976.
- Pin J.P. y Duvoisin R.**1995. Review: Neurotransmitter receptors I. The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure and Functions. *Neuropharmacology* 34(1):1-26
- Pines G., Danbolt N.C., Bjaras M., Zhang Y., Bendahan A., Eide L, Koepsell H., Storm Mathisen J., Seeberg E., Kanner B.I.** 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464-467.
- Pines G., Danbolt N.C., Bjaras M., Zhang Y., Bendahan A., Eide L, Koepsell H., Storm Mathisen J., Storck T., Schulte S., Hofmann K., and Stoffel W.** 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na<sup>+</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10955-10959.
- Monaghan D.T. and Cotman C.W.** 1986. Identification and properties of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain synaptic plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7532-7536.
- Rauen T., Rothstein J.D., Wässle H.** 1996. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res.* 286:325-336.

- Saito T.** and Kujiraoka. 1982. Physiological and morphological identification of two types of On center bipolar cells in the carp retina. *J. Comp. Neurol.* 205:161-170
- Salceda R.** 1988. El proceso de fototransducción en la retina de los vertebrados. *Ciencia* 39:9-13
- Salceda R.** and Vilehis C. 1994. High affinity uptake of glutamate and aspartate in the developing rat retina. *Curr. Eye Res.* 13:297-302.
- Salceda R.** 1995. Neurobiología de los sistemas sensoriales. Ed. Coordinación de la Investigación Científica, México. p 65-80.
- Sarantis M.,** Everett K. and Attwell D. 1988. A presynaptic action of glutamate at the cone output synapse. *Nature.* 332:451-453.
- Shiells R.A.** y Falk G. 1990. Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G- protein. *Proc R Soc Lond (Biol)* 242:91-94.
- Shiller P.H.** 1992. The ON and OFF channels of the visual system. *TINS* 15(3):86-92
- Slaughter M.M.** y Miller R. F. 1981. *Science* 211,182-184.
- Somohano F.** y López-Colomé A.M. 1990. Aminoácidos excitadores y plasticidad neuronal. *Ciencia* 41:111-122.
- 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.* 24:1193-1997.
- Sugawara, K.** and Negishi, K. 1973. Effects of some aminoacids on the horizontal cells membrane potential in the isolated carp retina. *Vision Res.,* 13, 2479-2489.
- Takubashi K.** and Copenhagen D.R. 1992. APB suppresses synaptic input to retinal horizontal cells in fish: a direct action on horizontal cells modulated by intracellular pH. *J. Neurophysiol.* 67(6):1633-1642
- Toyoshima C.** and Unwin N. 1988. Ion channel of Ach receptor reconstructed from images of postsynaptic membranes. *Nature* 336: 247-250.
- Unwin N.,** Toyoshima C. and Kubalek E. 1988. Arrangement of the acetylcholine receptor subunits in the resting and desensitized states, determined by cryoelectron microscopy of crystallized Torpedo postsynaptic membranes. *J. Cell Biol.* 107:1123-1138

- Werman R.** 1966. Criterius for identification of a Central Nervous System transmitter. *Comp. Biochem. Physiol.* 18:745-766.
- Williams K., Romano C., Ditcher M. y Molinoff P.** 1991. Modulation of the NMDA receptor of polyamines. *Life Sci.* 48:469-498.
- Zaczek R., Arlis S., Markl A., Murphy T., Drucker H and Coyle J.T.** 1987. Characteristics of chloride-dependent incorporation of glutamate into brain membranes argue against a receptor binding site. *Neuropharmacology* 26(4): 281-287.
- Zaczek R., Balm M., Arlis S., Drucker H., and Coyle J.T.** 1987. Quisqualate-sensitive, chloride-dependent transport of glutamate into rat brain synaptosomes. *J. Neurosci. Res.* 18:425-431.