

③ 207

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

"ESTUDIO BIOQUIMICO DE LOS CIRCUITOS NEURONALES
EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS"

Tesis que para obtener el Grado de
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

Presenta el M en IBB

JULIO EDUARDO MORAN ANDRADE

México, D.F.
Febrero de 1987.

TESIS CON
FALLA DE CAL



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.

El presente estudio se llevó a cabo en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. Herminia Pasantes-Morales, a quien agradezco la valiosa ayuda y el interés mostrado en la elaboración de este trabajo.

Este estudio fue financiado por donaciones del Fondo Ricardo J. Zevada y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (PCSAUNA-030775).

INDICE

I. ORGANIZACION GENERAL DE LA RETINA

1. INTRODUCCION

2. MORFOLOGIA DE LA RETINA

- 2.1. Fotorreceptores
- 2.2. Células horizontales
- 2.3. Células bipolares
- 2.4. Células amacriñas
- 2.5. Células ganglionares
- 2.6. Células interplexiformes
- 2.7. Aferencias retinales
- 2.8. Células ditasias

3. ELECTROFISIOLOGIA DE LA RETINA

- 3.1. Fotorreceptores
- 3.2. Células horizontales
- 3.3. Células bipolares
- 3.4. Células amacriñas
- 3.5. Células ganglionares
- 3.6. Células interplexiformes

4. NEUROQUIMICA DE LA RETINA

- 4.1. Transmisores de los fotorreceptores
 - 4.1.1. Acetilcolina
 - 4.1.2. Glutamato y aspartato
- 4.2. Transmisores de las células horizontales
- 4.3. Transmisores de las células bipolares
 - 4.3.1. Acetilcolina
 - 4.3.2. Aminoácidos excitadores
- 4.4. Transmisores de las células amacriñas
 - 4.4.1. GABA
 - 4.4.2. Glicina
 - 4.4.3. Taurina
 - 4.4.4. Acetilcolina
 - 4.4.5. Dopamina
 - 4.4.6. Otros candidatos
- 4.5. Transmisores de las células interplexiformes

II. RELACIONES FUNCIONALES EN LA RETINA: OBJETIVOS DEL ESTUDIO

1. METODOLOGIA GENERAL

2. RESULTADOS

- 2.1. Relación funcional de la taurina en la retina
 - 2.1.1. Introducción y antecedentes

- 2.1.2. Insensibilidad farmacológica de las células que liberan taurina por estimulación luminosa. Implicaciones con respecto a su relación con otras neuronas en la retina
- 2.2. Interacción de neuronas aminoacídérgicas en la retina de los vertebrados
 - 2.2.1. Introducción y antecedentes
 - 2.2.2. Efecto de los aminoácidos excitadores y de sus agonistas y antagonistas sobre la liberación de GABA y glicina de retina de pollo
- 2.3. Interacción de neuronas aminoacídérgicas y dopaminérgicas en la retina de los vertebrados
 - 2.3.1. Introducción
 - 2.3.2. Efecto de los aminoácidos excitadores sobre la liberación de dopamina-H⁺ en la retina de pollo
- 2.4. Interacción de los neurotransmisores en la retina de los vertebrados durante el desarrollo embrionario
 - 2.4.1. Introducción
 - 2.4.2. Aspectos morfológicos
 - 2.4.3. Aspectos neuroquímicos
 - 2.4.4. Efecto de los ácidos betaínaico y glutámico sobre la liberación de GABA-H⁺ en retina de conejo durante el desarrollo embrionario
 - 2.4.5. Efecto de los aminoácidos excitadores sobre la liberación de dopamina-H⁺ en retina de pollo durante el desarrollo embrionario
 - 2.4.5.1. Introducción
 - 2.4.5.2. Metodología
 - 2.4.5.3. Resultados
 - 2.4.5.4. Discusión

III. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

IV. CONCLUSIONES GENERALES

V. REFERENCIAS

RESUMEN

Una serie de evidencias bioquímicas y electrofisiológicas sugieren que los aminoácidos excitadores, glutamato y aspartato, pueden ser los transmisores de los fotorreceptores y de una subpoblación de células bipolares y amacrinas, mientras que el GABA y la taurina podrían ser usados por algunas neuronas horizontales y amacrinas como transmisores inhibidores. La dopamina parece funcionar como transmisor de algunas células amacrinas. Existen, sin embargo, algunas diferencias entre las distintas especies y a lo largo del desarrollo embrionario en cuanto a esta distribución de neurotransmisores.

En este trabajo se investigaron los circuitos neuronales que involucran a los aminoácidos excitadores e inhibidores y a la dopamina en la retina de 4 especies de vertebrados, así como el establecimiento de dichos circuitos durante el desarrollo embrionario.

Utilizando tanto un sistema de superfusión continua con retinas previamente incubadas con el transmisor marcado radioactivamente, así como mediante estudios autoradiográficos encontramos que:

1) La taurina aplicada exogenamente en la retina de pollo se acumuló principalmente en los segmentos externos de los fotorreceptores. La liberación de taurina estimulada por luz no se afectó en presencia de agonistas y antagonistas sinácticos de otros neurotransmisores. Estos resultados indicarían que la liberación de taurina estimulada por luz proviene de los fotorreceptores y por lo tanto es poco probable que esta participe directamente en los procesos de la transmisión sináptica en la retina.

2) Los aminoácidos excitadores aspartato y glutamato y su análogo kainato estimularon marcadamente la liberación de GABA en retinas de rana y pollo, pero no de rata o conejo. En el caso de las primeras la liberación ocurrió exclusivamente de células horizontales. Esto sugiere que en aves y anfibios las únicas células GABAérgicas que poseen receptores sinácticos para los aminoácidos excitadores son las células horizontales, mientras que en anfibios parece no haber interacciones directas entre ambos tipos de neuronas.

3) A diferencia de lo que ocurre en adulto, durante el desarrollo embrionario del conejo, la retina libera GABA por acción de los aminoácidos excitadores. Dicha liberación ocurrió exclusivamente de células horizontales, las cuales en la retina adulta no son capaces de acumular ni liberar GABA. Es posible que el GABA juegue un papel relacionado con la sinaptogénesis en este tejido.

4) En la retina de pollo adulto no existen circuitos neuronales que relacionen directamente neuronas aminoacidérgicas y dopaminérgicas. Sin embargo, durante un periodo en el desarrollo (del día 12 al 16 de incubación) los aminoácidos excitadores

estimulan marcadamente la liberación de dopamina. Es posible que durante ese período exista una relación directa y transitoria entre neuronas que manejan ambos compuestos que desaparece después de la eclosión.

Esta serie de evidencias indican que los circuitos neuronales, particularmente aquellos que involucran a los aminoácidos excitadores, sufren modificaciones durante el desarrollo embrionario. Por otra parte, en retinas maduras, los circuitos que relacionan directamente a estos aminoácidos con el GABA parecen no existir en mamíferos, mientras que en aves y anfibios dicha interacción estaría confinada únicamente entre los fotorreceptores (glu/asp) y células horizontales (GABA).

ABSTRACT

A large body of biochemical and electrophysiological evidences suggests that excitatory amino acids, glutamate and aspartate, are neurotransmitters for photoreceptors, bipolar and amacrine cells, while inhibitory amino acids, GABA and taurine, could be used by some horizontal and amacrine neurons as their transmitters. Also, dopamine has been proposed to play a transmitter role in a subpopulation of amacrine and interplexiform cells. However, all these transmitters and neuronal circuits involving them can show marked differences depending on vertebrate species studied as well as the developmental stage of the retina.

In the present work we investigated these neuronal circuits in the retina from different vertebrate species in which both excitatory and inhibitory amino acids as well as dopamine participate as neurotransmitters. Also, we studied the establishment of these circuits during retinal development.

Using both a superfusion technique and autoradiography of retinas previously loaded with labeled neurotransmitter, we found that:

1) Most of taurine exogenously applied was taken up by photoreceptor outer segments. Taurine released upon light stimulation was unaffected by a number of compounds that are known to block synaptic transmission. These results point to photoreceptors as the cells releasing taurine by light stimulation. Therefore, taurine released under these conditions is not directly involved in retinal synaptic circuits.

2) Aspartate, glutamate and kainate induced a massive GABA release from frog and chick retinas, but not from rat and rabbit retinas. Moreover, GABA released from frog and chick retinas occurred from horizontal cells. Thus, in these species, GABAergic horizontal cells are the unique kind of GABAergic neurons receiving direct synaptic input from excitatory amino acidergic neurons (i.e. photoreceptors). In contrast, it seems to be that

mammalian retina does not possess such neuronal pathway.

3) In contrast to that observed in mature rabbit retina, during the early stages of retinal development, excitatory amino acids stimulate GABA release. The sites of this GABA released were identified as neurons located in the horizontal cell layer showing an advanced state of maturation. It is possible that at this developmental stage this neurotransmitter could be directly involved in the processes of synaptogenesis of the retina.

4) In adult chick retina there was not stimulatory effect of excitatory amino acids on dopamine release. However, in the developing chick retina these compounds were effective in elicit dopamine release. This effect occurs during a short period of time in the development, showing a maximal effect at day 14 of incubation.

All these results suggest that neuronal circuits, particularly those involving excitatory amino acids, suffer modifications throughout the developmental processes leading to the establishment of the different neuronal pathways in mature retina. On the other hand, in mammalian mature retina there are not circuits involving GABAergic and amino acidergic neurons, while in avian and amphibian retinas that interaction seems to be restricted to photoreceptors (glu/asp-releasing cells) and horizontal GABAergic cells (glu/asp-receiving cells).

I. ORGANIZACION GENERAL DE LA RETINA

1. INTRODUCCION

La retina de los vertebrados es un tejido de origen ectodérmico neural (Colquhoun, 1961) que embriológicamente se forma a partir de la interacción que ejerce el cristalino sobre las vesículas localizadas en la parte anterior del tubo neural o prosencefalo. Dado que este tejido es una extensión del sistema nervioso central resulta sumamente útil para el estudio de los circuitos neuronales y de los mecanismos sinápticos, sobre todo si se consideran algunas de sus características morfológicas. La retina posee un número reducido de células, las cuales se encuentran ordenadas en capas definidas, fácilmente identificables. La actividad eléctrica de estas células puede registrarse intra o extracelularmente. Las condiciones experimentales para la activación de las vías neuronales de la retina pueden controlarse con relativa facilidad, ya sea sometiendo el tejido a la acción de distintos fármacos, o bien utilizando la luz como el estímulo fisiológico natural. Finalmente, debido a su localización anatómica, resulta sencillo extraerla del ojo y manipularla experimentalmente fuera de éste, sin que se deteriore su estructura o función.

2. MORFOLOGIA DE LA RETINA

La retina de los vertebrados se encuentra formada básicamente por cinco tipos neuronales (Fig. 1) (Ramon y Cajal, 1911; Dowling, 1979): los fotorreceptores, que son de 2 tipos: conos y bastones, las células bipolares y las interneuronas horizontales y amacrinas. Recientemente se ha descrito un sexto

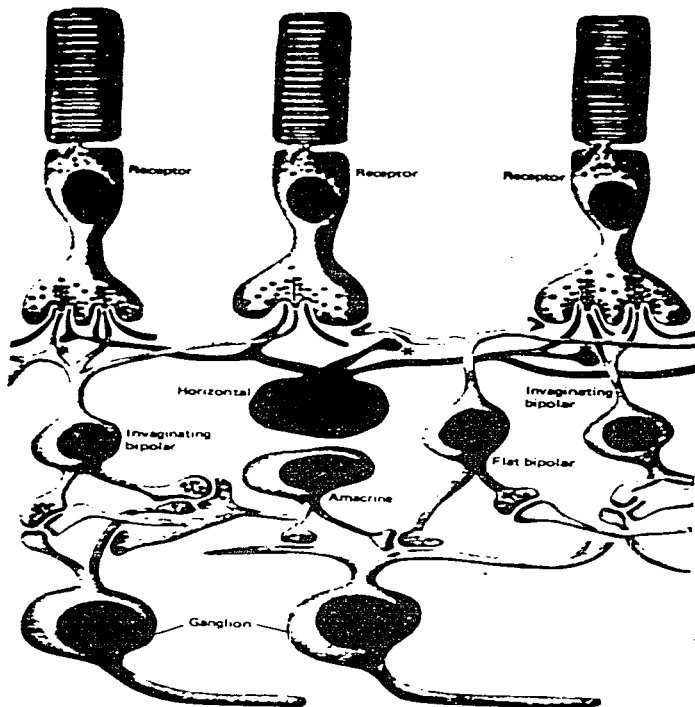


FIGURA 1.- Organización sináptica de la retina. La mayoría de los vertebrados poseen retinas que contienen tres tipos de sinapsis químicas: sinapsis "invaginantes", sinapsis "superficiales" y sinapsis convencionales. Las sinapsis "invaginantes" se localizan en las terminales de los fotorreceptores y de las células bipolares y se caracterizan por poseer una barra electrodensa rodeada por vesículas sinápticas; en la capa plexiforme externa los elementos postsinápticos están constituidos por dos procesos de células horizontales y una dendrita de una célula bipolar "invaginante". Las sinapsis "superficiales" se realizan exclusivamente entre la terminal del fotorreceptor y la dendrita de una célula bipolar "plana". El resto de las sinapsis - (marcadas por un asterisco) son del tipo convencional. La figura muestra las principales conexiones sinápticas. (Tomado de Dowling, 1979).

tipo neuronal denominado interplexiforme (Ehinger et al 1969; Boycott et al 1975; Dowling y Ehinger, 1975; 1978a). Todas estas neuronas se encuentran organizadas en estratos bien definidos, de manera que en un corte transversal se pueden diferenciar al microscopio óptico diversas capas formadas por parte de cada una de las células (Fig. 2): la capa de los fotorreceptores, formada por los segmentos externos e internos de los conos y bastones; la capa nuclear externa, constituida por los núcleos de los fotorreceptores; la capa plexiforme externa, conteniendo los contactos sinápticos entre fotorreceptores, células bipolares y células horizontales; la capa nuclear interna, compuesta por los núcleos de las células horizontales, bipolares y amacrinas; la capa plexiforme interna, conformada por las sinapsis entre células bipolares, amacrinas y ganglionares; y la capa de las células ganglionares, cuyos axones en conjunto forman el nervio óptico.

2.1. Fotorreceptores

Colocados en contacto directo con el epitelio pigmentario, se localizan los fotorreceptores, que como ya se mencionó pueden ser conos o bastones. La relación numérica entre conos y bastones en la retina depende fundamentalmente de la forma de vida de la especie. Así, en las especies con hábitos nocturnos como la rata, hay una mayor proporción de bastones que de conos, mientras que en las diurnas, como en el caso del pollo, ocurre lo contrario (Pearson, 1972). En algunas especies como el pollo y la rana, se presentan fotorreceptores pareados o dobles que se comportan como una sola célula. Los fotorreceptores están constituidos por un

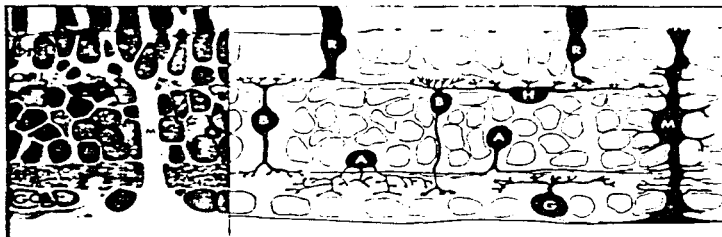


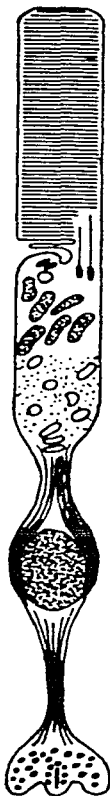
FIGURA 2.- Capas celulares de la retina en un corte longitudinal. Izquierda: micrografía de la retina de salamandra en la cual se observan las tres capas nucleares y las dos capas plexiformes, así como una célula de Muller (M). ONL:capa nuclear externa; OPL:capa plexiforme externa; INL:capa nuclear interna; IPL:capa plexiforme interna; - GCL:capa de células ganglionares (235X). Derecha: localización de los tipos neuronales de la retina responsables de la formación de las capas celulares mencionadas. Nótese que las capas plexiformes están constituidas por las terminales nerviosas de las diferentes neuronas, mientras que los somas neuronales conforman las capas nucleares. R: fotorreceptores; H: células horizontales; B: células horizontales; A: células amacrinas; G: células ganglionares; M: células gliales de Muller. (Tomado de Dowling, 1979).

segmento externo, un segmento interno, una zona nuclear y un cuerpo sináptico (Fig. 3).

El segmento externo está constituido por pilas de discos lamelares o sáculos aplanados de doble membrana, estrechamente empaquetados y orientados en ángulo recto al eje de la célula. Estos sacos están envueltos por la membrana celular y están constituidos por fosfolípidos y proteínas, las cuales básicamente son constituyentes de los pigmentos fotocensibles.

El segmento interno está unido al externo por medio de una estructura de conexión, constituida por un cilio de nueve filamentos. En el segmento interno se localizan una gran cantidad de mitocondrias, alineadas paralelamente al eje longitudinal de la célula. En algunas especies, los conos presentan una gota aceitosa de diferentes colores, que parece funcionar como un filtro para determinadas longitudes de onda. La porción medio del segmento interno posee una gran cantidad de microtubulos y microfilamentos que probablemente estén involucrados en los mecanismos de contracción de esta parte de la célula. La zona nuclear contiene el núcleo que es generalmente ovalado o esférico y se encuentra rodeado por neurofibrillas. Frecuentemente existen uno o más nucleólios y cantidades considerables de glucógeno.

Las terminales sinápticas de los receptores, localizadas en la capa plexiforme externa, hacen contacto con las prolongaciones de las células horizontales y las dendritas de las células bipolares. Tales contactos se han catalogado en 2 tipos de acuerdo con su morfología (Figs. 1, 4a y 4f): uno de ellos ocurre dentro de invaginaciones de la membrana presináptica del receptor en las que penetran dos prolongaciones de células horizontales



Segmento
externo

Estructura de
conexión

(elipsoide)

Segmento
interno

(mioide)

Fibra

Núcleo

Fibra

Cuerpo sináptico

Esq. 2.- Representación de un fo-
torreceptor típico de la retina
de los vertebrados. Esta célula
elongada está organizada de manera
segmentaria, y cada segmento tiene
una estructura y función especiali-
zadas.

(Tomado de Young, 1969)

rodeando a una dendrita de las células bipolares denominadas "invaginantes" (Stell, 1965; Nisicotten, 1965). Esta sinapsis, conocida como "invaginante" posee en la parte presináptica una "barra" o "listón" electrodenso rodeado por una serie de vesículas sinápticas (Fig. 4a) (Misscotten, 1965; Dowling, 1979). El segundo tipo de sinapsis de los fotorreceptores se realiza exclusivamente con las células bipolares denominadas "superficiales" o "Planas" las cuales también son postsinápticas a los fotorreceptores, pero el contacto no ocurre dentro de una invaginación ni se presenta la "barra" o los agregados de vesículas sinápticas (Fig. 4b) (Misscotten, 1965; Dowling, 1979).

Además de estos contactos de tipo químico, se han identificado uniones electrotonicas entre fotorreceptores en la mayoría de los vertebrados. Las uniones electrotonicas mas frecuentes ocurren entre bastones y conos así como entre conos y conos.

2.2. Células horizontales

Las células horizontales poseen un cuerpo celular grande localizado en la parte externa de la capa nuclear interna y sus procesos se confinan exclusivamente a la capa plexiforme externa (Figs. 1 y 2). Se ha mencionado que los procesos presinápticos de las células horizontales carecen de vesículas sinápticas, al menos en vertebrados inferiores (Stell, 1967; Marc et al. 1978), lo que ha llevado a pensar en un mecanismo de liberación no vesicular mediado por un acarreador (Yazulla y Kleinschmidt, 1981; Schwartz, 1982). Las observaciones al microscopio electrónico indican que los procesos de estas células, además de

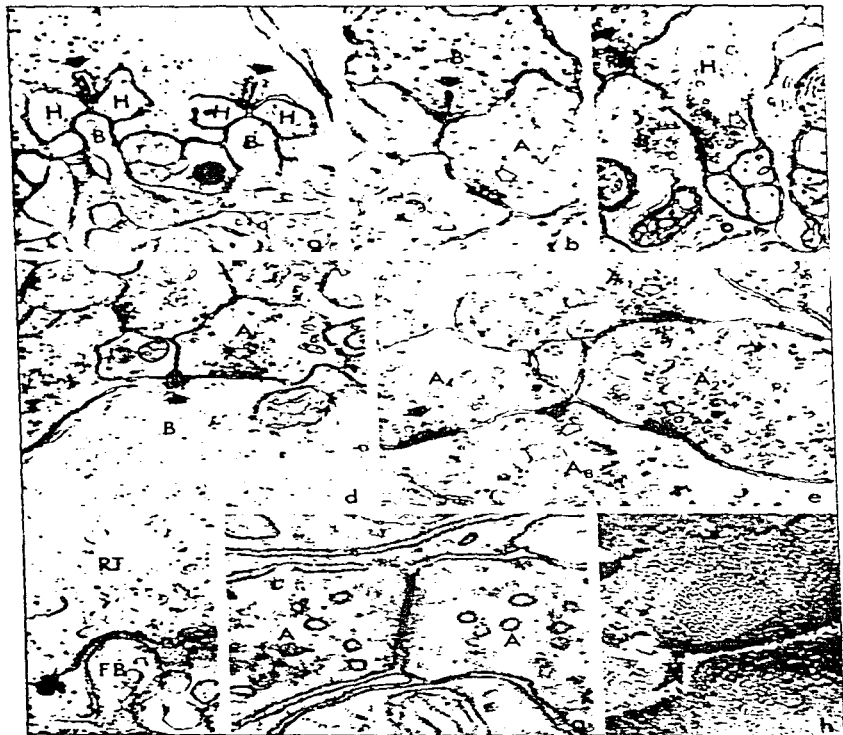


FIGURA 4.- Algunos ejemplos de contactos sinápticos observados por microscopía electrónica en la retina de los vertebrados.

(a): Sinapsis "invaginantes" (flechas) en la terminal de un cono de la retina de mono. En cada sinapsis se observan tres procesos que - penetran en la terminal del fotorreceptor; dos de éstos pertenecen a células horizontales (H) y el tercero a una célula bipolar (B).

(b): Contacto sináptico entre una célula bipolar y una amacrina en la capa plexiforme interna de la retina de pollo. La terminal de la célula bipolar (B) presenta una estructura semejante a la de la terminal del fotorreceptor (flecha oscura); la célula amacrina (A), además de recibir información sináptica de la célula bipolar, es presináptica a otra célula (flecha clara).

(c): Sinapsis convencional entre una célula horizontal y una célula bipolar en la retina de salamandra. La célula horizontal (H), además de conectar con una célula bipolar (B) (flecha clara), es postsináptica a la terminal del fotorreceptor (flecha oscura).

(d): Sinapsis recíprocas entre una célula bipolar y una amacrina en retina de pez. Tanto la célula bipolar (B) como la amacrina (A) son pre y postsinápticas en la misma sinapsis (flechas).

(e): Sinapsis en serie y recíprocas de cuatro células amacrinas en la retina de rana. Las flechas claras indican las sinapsis en serie entre las células A₁, A₂ y A₃; la flecha oscura muestra una sinapsis recíproca entre las células A₃ y A₄.

(f): Sinapsis "superficial" entre la terminal del receptor (RT) y la dendrita de una célula bipolar "plana" (FB) en la retina de rana. Este tipo de sinapsis no muestra la barra electrodensa ni la invaginación presináptica que caracteriza a la sinapsis "invaginante"

(g): Sinapsis electrotónica entre dos células amacrinas (A) en la retina de rata. Nótese que el espacio extracelular entre los dos procesos es muy estrecho y que ambos lados de la unión poseen vesículas sinápticas.

(h): Unión estrecha en la capa plexiforme interna de la retina de rata obtenida por el método de criofractura. Las numerosas partículas, densamente empaquetadas, poseen un diámetro de 80 a 100 Å y son similares a las observadas en las uniones estrechas de otros tejidos. (Tomado de Dowling, 1979).

ser postsinápticos a las terminales de los receptores (Fig. 4a), conectan con los procesos de otras células horizontales. Además, éstas pueden ser postsinápticas a los somas de las células bipolares y presinápticas a las dendritas de las bipolares en el complejo de la triada (Figs. 1 y 4c) (Powling, 1970).

Los estudios citológicos han demostrado la existencia de dos tipos de células horizontales: las células de axón corto (Ramón y Cajal, 1911) y las células sin axón (Gallego, 1982), consideradas por mucho tiempo como células gliales pequeñas. Las células de axón corto comunican las sinapsis entre las células bipolares y los conos con las sinapsis entre las células bipolares y los bastones, mientras que las células sin axón, sólo conectan con conos. Ambos tipos de células horizontales se han identificado en todos los grupos de vertebrados, excepto en primates, cuyas retinas sólo presentan células horizontales de axón corto (Gallego, 1982).

Se ha sugerido también que algunas células horizontales podrían enviar colaterales al pie terminal de los fotorreceptores, especialmente los conos. Tal afirmación se basa en una serie de evidencias electrofisiológicas que muestran una alteración de la actividad del receptor mediada por acción de las células horizontales (Lam et al., 1978; Wu y Powling, 1979); sin embargo, no existen pruebas morfológicas que apoyen esta posibilidad. Además de las sinapsis de tipo químico descritas arriba, se han reportado acoplamientos de tipo electrotónico entre diversas subpoblaciones de células horizontales en retinas de diversas especies (Piccolino, 1986) y aparentemente dichas uniones se establecen entre células horizontales sin axón

(Gallego, 1982).

2.3. Células bipolares

Los somas de las células bipolares se localizan en la capa nuclear interna y sus prolongaciones conectan las dos capas plexiformes (Figs. 1 y 2). Sus terminales, localizadas en la capa plexiforme interna, establecen contactos con las prolongaciones de las células amacrinas y ganglionares (Matsotten, 1965; DeGrip y Boycott, 1966; Brandon *op. cit.* 1980). En la gran mayoría de los casos se presentan dos sinapsis en una sola terminal de la célula bipolar formando una estructura denominada diada la cual presenta un listón electrodenso semejante al presente en las sinapsis "invaginentes" de los fotorreceptores. (Fig. 3 b y d) (Dowling y Boycott, 1966). Las sinapsis pueden realizarse con una prolongación de una célula y una dendrita de una célula ganglionar, o bien con dos procesos de células amacrinas, pudiendo ser estos pre o postsinápticos (Werblin, 1979). Además, se han observado uniones con características de sinapsis eléctricas entre células bipolares y amacrinas (Kolb y Famiglietti, 1974).

2.4. Células amacrinas

Las células amacrinas que al igual que las células horizontales, se consideran carentes de axón corto (Dowling y Boycott, 1966; Dowling, 1970), contienen sus núcleos en la parte más interna de la capa nuclear interna y extiende sus prolongaciones exclusivamente a la capa plexiforme interna (Figs. 1 y 2). En esta capa, además de establecer contactos pre o postsinápticos con las células bipolares, conecta con las dendritas de las

células ganglionares y con los procesos de otras células amacrinas (Fig. 4 b, d, e) (Werblin, 1979; Brandon et al 1980). Asimismo, se han descrito uniones eléctricas entre células amacrinas (Fig. 4 g, h) y los procesos de las células amacrinas y células bipolares (Kolb y Famiglietti, 1974). Se ha detectado otro tipo de células amacrinas conocidas como amacrinas desplazadas, dado que sus somas se localizan en la capa de células ganglionares. La proporción numérica de dichas células depende de la especie y de la zona de la retina, pudiendo alcanzar hasta un 40% del total de neuronas de la capa ganglionar (Erich y Morgan, 1980).

2.5. Células ganglionares

Las células ganglionares cuyos somas forman la capa que lleva su nombre, son el último relevo de los circuitos neuronales de la retina. Como ya se mencionó, las dendritas de estas células son postsinápticas, en todos los casos, a los procesos de las células amacrinas y a las terminales de las células bipolares (Fig. 1). Recientemente se ha descrito mediante técnicas citoquímicas en retinas de primate, la presencia de células ganglionares bplexiformes, las cuales además de conectar en la capa plexiforme interna como las células ganglionares convencionales, extienden dendritas a la capa plexiforme externa y establecen contactos postsinápticos con la terminal de los conos dentro de las sinapsis "invaginantes" (Mariani, 1982). En todos los casos, los axones de las células ganglionares se unen para formar el nervio óptico que saldrá del ojo para alcanzar otros puntos de relevo en diferentes áreas del SNC.

Finalmente se han identificado células ganglionares desplazadas en retinas de aves. Estas células se localizan en el borde interno de la capa nuclear interna y proyectan hacia el núcleo de la raíz óptica basal (Hayes, 1986).

2.6. Células interplexiformes

Recientemente se ha demostrado por microscopía de fluorescencia, (Ehinger et al., 1982), así como por estudios con la técnica de Golgi (Boycott et al., 1975), la existencia en las retinas de peces y mamíferos de otro tipo neuronal denominado interplexiforme. Los somas de estas células residen en la porción interna de la capa nuclear interna y sus procesos se extienden profusamente en la capa plexiforme interna y externa, donde se ramifican extensamente.

La organización sináptica de las células interplexiformes aún no ha sido completamente aclarada debido a su baja proporción numérica en la retina, así como a la variabilidad de sus conexiones entre las diferentes especies estudiadas. Sin embargo, se sabe que la única entrada sináptica que reciben estas células está mediada por las neuronas amacrinas en la capa plexiforme interna (Dowling, 1972; Dowling et al., 1976), aunque recientemente se ha sugerido para un tipo celular interplexiforme en la retina de carpa que también pueden recibir información sináptica de los somas de algunas células horizontales del tipo H1 (Marc y Lam, 1981b). En la capa plexiforme externa, los procesos de las células interplexiformes son presinápticos a las prolongaciones de algunas células horizontales y probablemente a las dendritas de ciertas células bipolares "invaginantes"

(Dowling, 1979; Marc y Lam, 1981b; Ehinger, 1982), mientras que en la capa plexiforme interna son presinápticos a algunas células amacrinas y bipolares (Dowling, et al., 1976; Kolb y West, 1977; Ehinger, 1982).

2.7. Aferencias retinales

Por otra parte, cabe mencionar que las retinas de algunas especies, básicamente de aves, reciben fibras aferentes provenientes del cerebro medio-medio. Estas fibras, descritas inicialmente por Ramón y Cajal (1893), provienen del núcleo istmo-óptico en el pollo (Miles, 1972) y parecen llegar sobre o cerca de los somas de las células amacrinas colocadas en la parte más interna de la capa nuclear interna de la retina de pollo (Cowan y Powell, 1963). De la misma manera, se han detectado, aunque en menor número terminales de este tipo en retinas de chimpancé y de gato. Estas fibras pueden llegar a todas las áreas de la retina, excepto a la fovea central (Hayes, 1982).

2.8. Células Gliales

Además de las células mencionadas anteriormente, existe otro tipo celular de origen glial, cuya función se cree es la de nutrir, separar y aislar las neuronas de la retina y se les conoce como células de Muller (Weisch y Storch, 1973; Ramón y Cajal, 1911). Estas células tienen una función importante en la regulación del microambiente de la retina. Entre otras funciones, las células gliales son capaces de acumular y metabolizar los aminoácidos neurotransmisores, así como de contribuir con productos y precursores útiles para el metabolismo neuronal. Las células de Muller se localizan verticalmente a lo largo de toda la retina

emitiendo prolongaciones gruesas a nivel de las capas nucleares, así como prolongaciones largas por debajo de las fibras del nervio óptico, formando la membrana limitante interna: en la parte apical, sus prolongaciones se aplanan y se unen mediante uniones estrechas, a las de otras células gliales, formando a nivel de los segmentos externos de los fotorreceptores la membrana limitante externa (Fig. 2) (Ramón y Cajal, 1911; Walsch y Storch, 1973).

A pesar de que existen algunas diferencias en las conexiones entre los diferentes tipos celulares de la retina dependiendo de la especie, la organización sináptica de la retina de los vertebrados se puede resumir de la siguiente manera: los receptores establecen contactos sinápticos con las células horizontales y bipolares; las células horizontales conectan con las bipolares y probablemente con los receptores; en la capa plexiforme interna, las células bipolares contactan con las amacrinas y las ganglionares; las células amacrinas, a su vez, hacen sinapsis con las bipolares, ganglionares, interplexiformes y con otras amacrinas; finalmente, las células interplexiformes conectan con las células horizontales y bipolares. Así, las células ganglionares recogen toda la información procesada en la retina a través de las entradas sinápticas provenientes de células bipolares, amacrinas y en algunos casos, de los fotorreceptores.

3. FISILOGIA DE LA RETINA

3.1. Fotorreceptores

En la retina, la luz debe viajar a través de las capas más proximales antes de alcanzar los primeros elementos de la vía visual, los fotorreceptores. De acuerdo con su morfología y fisiología se conocen dos clases de receptores: los conos, que median la visión en color a altas intensidades de luz (visión fotópica) y los bastones, los cuales son utilizados en la visión nocturna y poseen una gran sensibilidad a la luz verde-azul (visión escotópica). Las diferencias en las respuestas entre ambos tipos de receptor se deben, en parte, al pigmento fotosensible utilizado por cada uno, así como al patrón de conexiones que establecen con el resto de los elementos neuronales de la retina (Bailey, 1981).

Los estudios basados en los registros intracelulares del fotorreceptor, han demostrado que durante la obscuridad la membrana de este se mantiene despolarizada (Bartoff y Norton, 1965) debido a una entrada continua de iones sodio al interior del segmento externo, denominada "corriente oscura de sodio". Cuando la luz incide sobre los pigmentos fotosensibles presentes en las membranas de los discos del segmento externo, dicha corriente se suprime y provocan que el receptor se hiperpolarice (Yoshikami y Hagins, 1973). La respuesta de los receptores ante la estimulación luminosa posee las características de un potencial sostenido inhibitorio con una amplitud proporcional a la intensidad del estímulo (Fig. 5). Estas respuestas nunca producen potenciales de acción. Se ha propuesto que la reducción

de la "corriente oscura de sodio" se produce primariamente por un incremento en el calcio libre intracelular liberado de los discos del segmento externo por accion de la luz sobre los pigmentos fotosensibles (Hagins y Yoshikami, 1974); o bien por una disminucion en los niveles de GMP ciclico provocada por accion de una fosfodiesterasa durante la fotoactivacion (Farber y Brown, 1973). Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos que se llevan a cabo durante la fototransduccion, se sabe que durante la obscuridad, el estado despolarizado de los fotorreceptores lleva a una liberacion constante de transmisor de su terminal (Trifonov, 1968). Existe una serie de evidencias que prueban que dicha liberacion de transmisor ocurre durante la obscuridad. Asi, se ha demostrado que en ausencia de luz se produce un considerable aumento en el recambio de las vesiculas sinapticas, en las que se almacena el transmisor liberable en la terminal de los fotorreceptores (Schacher et al., 1974).

Por otra parte, en ensayos realizados en la obscuridad, los iones magnesio, cobalto, y manganeso, los cuales se sabe que bloquean la liberacion de neurotransmisores por interaccion con los flujos de calcio (del Castillo y Katz, 1954), producen una hiperpolarizacion de las células horizontales, semejantes al efecto fisiológico de la luz (Fig. 5) (Howling y Ripps, 1972). Estos resultados, además de probar la liberación tónica del transmisor durante la obscuridad, sugieren la naturaleza excitadora de dicho transmisor liberado por la terminal del receptor. Se ha demostrado que en presencia de luz, cuando disminuye la liberación del transmisor de los receptores, ocurre un incremento en la resistencia de la membrana de las células

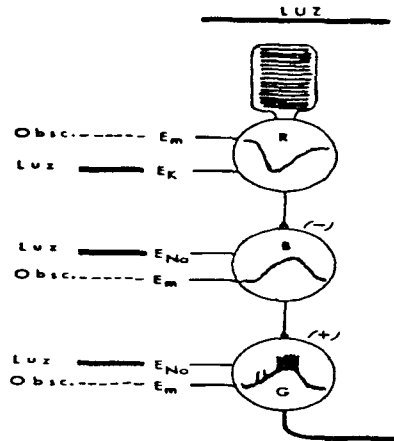


FIGURA 5.- Polarización de las células que constituyen la vía neuronal directa de la retina. En el diagrama se muestra la respuesta de una célula bipolar "despolarizante" (B); sin embargo, la vía directa puede incluir a una célula bipolar "hiperpolarizante". Durante la oscuridad, la "corriente oscura de sodio" mantiene el potencial de membrana (E_m) del receptor (R) en un nivel relativamente bajo; en presencia de luz la conductancia al sodio disminuye y el receptor se hiperpolariza. Esta hiperpolarización produce una reducción en la liberación del transmisor que actúa sobre la célula bipolar, lo que lleva a esta última a un estado despolarizado. La desinhibición de la célula bipolar produce un incremento en la liberación de su transmisor (excitador) ocasionando una excitación de la célula ganglionar (G). (Adaptado de Dowling, 1979).

bipolares "Planas" (Tomita, 1970; Nelson, 1973), al igual que en la membrana de las células horizontales. Esto implicaría que el transmisor liberado durante la obscuridad incrementa la conductancia de la membrana postsináptica y como consecuencia la despolariza (Fig. 5) (Werblin, 1979).

Una de las características de la organización funcional de la retina es la presencia de vías centrales constituidas por la interacción directa entre los fotorreceptores, las células bipolares y las células ganglionares. Tales vías pueden modularse por la acción de dos sistemas de neuronas laterales, el de las células horizontales y el de las amacrinas. Esta organización funcional se refleja en la respuesta antagonica de las poblaciones específicas neuronales dentro de cada campo receptivo de los fotorreceptores (Fig. 6).

3.2. Células horizontales

Las células horizontales son neuronas de segundo orden que intervienen en la retina como interneuronas asociativas laterales. Las propiedades fisiológicas, al igual que las de los fotorreceptores y células bipolares, difieren de las presentes en la mayoría de las neuronas del SNC. Estas células se caracterizan por presentar respuestas graduadas, tanto hiperpolarizantes como despolarizantes ante los estímulos fisiológicos mediados por los fotorreceptores (Fig. 5). En la obscuridad, las células horizontales sufren una despolarización, mientras que en la luz se hiperpolarizan, generando un potencial lento (potencial S). Estas células carecen de canales de sodio sensible a voltaje y la propagación del impulso nervioso no se presenta como su potencial

de acción sino electrotonico. Finalmente, como ya se mencionó, algunas de estas células, básicamente neuronas horizontales sin axón, son capaces de establecer contactos electrotonicos entre ellos, llegando a formar extensas redes de neuronas comunicadas eléctricamente.

3.3. Células bipolares

Las células bipolares se han catalogado, de acuerdo con su respuesta fisiológica, en células "hiperpolarizantes" o "apagadas" y en células "despolarizantes" o "encendidas", correspondientes a los tipos morfológicos "bipolar plana" y "bipolar invaginante" respectivamente (Dowling, 1979). En el primer caso, la célula se hiperpolariza cuando se da un estímulo luminoso "central", es decir, cuando se estimulan los fotorreceptores que conectan directamente con estas células bipolares (Fig. 6). Tal hiperpolarización ocurre como consecuencia de la disminución en la liberación del transmisor de la terminal del fotorreceptor; esto produce a su vez una disminución en el potencial de membrana de la célula bipolar, la cual se encuentra parcialmente despolarizada previamente a la iluminación. En el caso de las células "invaginantes" o "despolarizantes", la estimulación "central" produce una despolarización (Fig. 7) que, al igual que la respuesta de las células "hiperpolarizantes", es ocasionada por una reducción en el transmisor liberado por el fotorreceptor; sin embargo, en este caso, la naturaleza del receptor postsináptico, que interactúa con el mismo neurotransmisor, es de tipo inhibitorio (Bailey, 1981). De esta manera, las células "despolarizantes" se mantienen

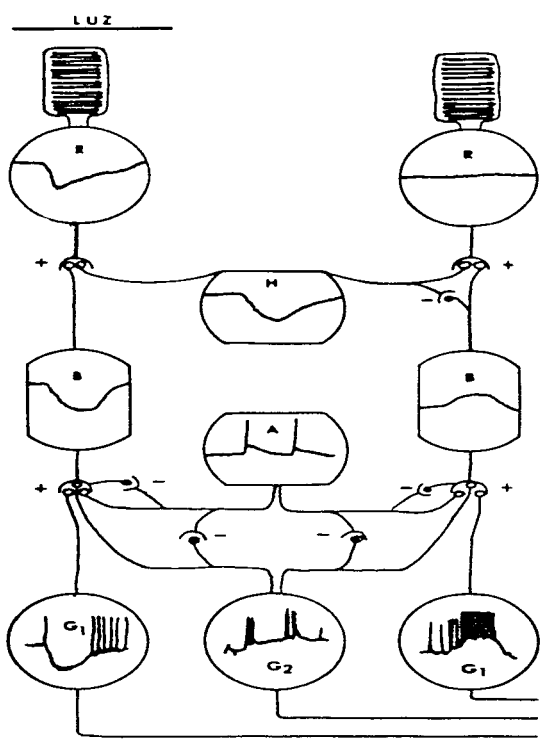


FIGURA 6.- Organización de los campos receptivos de las células bipolres "hiperpolarizantes" y células ganglionares "encendidas" y "apagadas". Las respuestas electrofisiológicas mostradas en el esquema se presentan cuando el receptor recibe la estimulación luminosa (barra - oscura). Las células bipolares "hiperpolarizantes" y las células - ganglionares de centro "encendido" (células de la izquierda) se hiperpolarizan ante la estimulación central directa, mientras que la iluminación periférica (lado derecho) produce una despolarización de estas mismas células. Nótese que la influencia de las células - horizontales en la unión entre el receptor y las células bipolares es determinante en la polaridad de la respuesta de las células periféricas. Las células ganglionares "encendidas/apagadas" (G_2) reciben entradas inhibitorias de las células amacrinas (A), así como entradas excitadoras de células bipolares (B); mientras que las - células ganglionares "apagadas" (G_1) reciben información sináptica exclusivamente de células bipolares. En este diagrama no se mues- tran las respuestas del tercer tipo de célula ganglionar denominada "encendida", que recibe información sináptica básicamente de células amacrinas inhibitoras. (Tomado de Dowling, 1979).

en un estado hiperpolarizado durante la obscuridad por acción del transmisor liberado, el cual al reducir su flujo en presencia de luz, produce una desinhibición que lleva a un aumento en el potencial de membrana de estas células.

Para ambos tipos de células bipolares, existe un antagonismo entre las respuestas de las células bipolares que reciben una estimulación "central" y aquellas que pertenecen al mismo campo receptivo, pero que no reciben la información directa del fotorreceptor y se localizan en la zona periférica de dicho campo. Así, cuando las células "centrales" se hiperpolarizan por acción de la luz, las células bipolares circundantes al estímulo "central" se despolarizarán y viceversa (Fig. 5) (Hubel y Wiesel, 1960; Dowling, 1979). Por otra parte, las evidencias basadas en ensayos farmacológicos y electrofisiológicos (Naka, 1977; Werblin, 1979), así como en estudios morfológicos de criofractura (Raviola y Raviola, 1982) sugieren que las terminales de las células bipolares "encendidas" y "apagadas" establecen contactos sinápticos excitadores con otras neuronas.

La formación de los campos concéntricos antagonicos, observados en las células bipolares, es una consecuencia de la interacción de las células horizontales con las vías "centrales" directas (Fig. 6) (Werblin, 1979). Como ya se mencionó, la incidencia de luz sobre los fotorreceptores produce una reducción en la liberación del neurotransmisor excitador que actúa sobre las células bipolares y horizontales, provocando en estas últimas una hiperpolarización. De esta manera, las prolongaciones inhibitorias de las células horizontales que alcanzan otras células bipolares circundantes al estímulo central, reduciría la

liberación de su transmisor y afectarían el potencial de estas células periféricas, produciendo el antagonismo entre el centro y la periferia del campo receptivo (Fig. 5) (Dowling, 1970). Así, la respuesta bipolar "central" parece estar mediada por la unión receptor-célula bipolar, mientras que la respuesta antagonista periférica estaría dada a través de la vía formada por los fotorreceptores, células horizontales y células bipolares (Fig. 5).

3.4. Células amacrinas

En la capa plexiforme interna, las células amacrinas generalmente producen una respuesta transitoria, sin importar la configuración del estímulo recibido por el receptor (Dowling, 1979). Las respuestas transitorias depolarizantes usualmente producen de una a dos espigas (Fig. 5), aunque el número de estas puede variar de acuerdo a la especie registrada (Werblin y Dowling, 1969). Por otra parte, se han detectado en algunas especies, células amacrinas que producen respuestas sostenidas hiperpolarizantes o despolarizantes dependiendo de la longitud de onda del estímulo luminoso empleado (Ioyoda, et al., 1973). El sistema lateral de neuronas amacrinas, al igual que las células horizontales, es capaz de modificar la información directa, actuando específicamente sobre las células ganglionares (Fig. 6) (Werblin, 1970; Miller, 1979). La gran mayoría de las células amacrinas establecen sinapsis inhibitorias con otras neuronas (Raviola y Raviola, 1982), particularmente con células bipolares y células ganglionares "transitorias" (Werblin, 1970; Dowling, 1979), sin embargo algunas células amacrinas pueden realizar contactos excitadores con otras células amacrinas o con algunas células

ganglionares (Werblin, 1979; Glickman et al, 1982).

3.5. Células ganglionares

Fisiológicamente se han detectado dos tipos de células ganglionares. El primero se comporta de una manera semejante a las células bipolares: en presencia de la estimulación "central", se produce un potencial lento sostenido con una serie de espigas, mientras que las células periféricas del mismo campo receptivo dan una respuesta antagonica sostenida (células G₁ de la fig. 6). (Dowling, 1979). Las células ganglionares que se despolarizan con un potencial sostenido ante el estímulo "central" se denominan "células sostenidas de centro encendido" y aquellas que se hiperpolarizan ante la iluminación "central" se conocen como "células sostenidas de centro apagado". Ambos tipos de células con respuesta sostenida reciben entradas sinápticas directamente de las células bipolares sin una intervención importante de las células amacrinas (Fig. 6) (Miller, 1979). El segundo tipo de células ganglionares, denominadas "transitorias", recibe la mayoría de la información visual a través de las células amacrinas (célula G₂ de la Fig. 6). La respuesta de estas células ante los estímulos luminosos centrales, semeja la respuesta producida por las células amacrinas, exhibiendo potenciales transitorios excitadores (células "encendidas"), inhibidores (células "apagadas" o bifásicos (células "encendidas/apagadas"). Una característica de este tipo de respuesta es la presencia de numerosas espigas sobre el potencial despolarizante transitorio. El número de tales espigas dependerá de la intensidad del estímulo recibido (Dowling, 1979). Existen

suficientes evidencias que demuestran que estas células responden muy bien al movimiento del estímulo y muchas de ellas son capaces de dar respuestas selectivas a la direccionalidad de este (Norton *et al.* 1970; Werblin, 1970). Dado que las respuestas mostradas por las células ganglionares "transitorias" están dirigidas por la acción de las células amacrinas, se ha propuesto que estas últimas son las responsables de los mecanismos de detección del movimiento y la direccionalidad del estímulo (Werblin, 1970).

3.6. Células Interplexiformes

Se ha sugerido que uno de los papeles de las células interplexiformes, en la capa plexiforme externa, es la regulación del antagonismo entre el centro y la periferia del campo receptivo, ya que tales células reducen los efectos inhibitorios laterales de las neuronas horizontales y aumentan las respuestas de las células bipolares "despolarizantes" (Howling, 1979); mientras que en la capa plexiforme interna podrían disminuir los efectos laterales inhibitorios mediados por las células amacrinas "transitorias", ya que la dopamina liberada por las células interplexiformes despolariza y desensibiliza a las células amacrinas "transitorias" y no a las "sostenidas".

En conclusión, el procesamiento de la información visual en la capa plexiforme externa, se relaciona principalmente con los elementos estáticos y espaciales del estímulo, ya que las neuronas que participan en esta capa responden básicamente con potenciales sostenidos y sus interacciones acentúan el contraste de la imagen retinal mediante organización de las respuestas antagonicas entre el centro y la periferia del campo receptivo a

nivel de las células bipolares (Dowling, 1979). Por otra parte, la capa plexiforme interna parece estar más relacionada con el procesamiento de los aspectos dinámicos o temporales de la estimulación, puesto que las células amacrinas y ganglionares "transitorias" acentúan los cambios en la iluminación retinal y responden eficientemente ante los movimientos del estímulo (Warblin, 1970; Norton *et al.*, 1970; Dowling, 1979).

4. NEUROQUIMICA DE LA RETINA

A pesar del extenso conocimiento que se tiene acerca de la morfología e interconexiones de los elementos celulares de la retina, aún existen múltiples dificultades en la identificación de los neurotransmisores empleados por cada tipo neuronal. En la actualidad, se han propuesto como candidatos transmisores en la retina a una serie de compuestos neuroactivos entre los cuales se incluyen algunos aminoácidos, catecolaminas, serotonina, acetilcolina y una gran variedad de péptidos. La multiplicidad de tales candidatos se debe en gran parte a la existencia de diferentes subpoblaciones del mismo tipo celular, las cuales manejan diferentes transmisores (Tabla 1); sin embargo, es probable que parte de esta diversidad sea el resultado de análisis experimentales insuficientes.

4.1. Transmisores de los fotorreceptores

4.1.1. Acetilcolina

En la capa plexiforme externa, se sabe que el transmisor liberado por la terminal de los fotorreceptores es de naturaleza

excitadora (Tomita, 1970; Bowling y Rippe, 1972; Nelson, 1973; Werblin, 1979) y los candidatos propuestos para desempeñar esta función son la acetilcolina (AC) y los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato. En el caso de la acetilcolina, existen ciertas evidencias que favorecen tal posibilidad, particularmente en los conos de vertebrados inferiores, como son: la unión específica de agonistas de la AC en la capa plexiforme externa de retina de tortuga y de carpa (Yazulla y Schmidt, 1976); el efecto despolarizante de la AC sobre células horizontales de retina aislada de carpa (Kaneko y Shimazaki, 1976) y la acción bloqueadora de la atropina, un antagonista muscarínico de los receptores colinérgicos, sobre la transmisión sinéptica entre conos y células horizontales de retina de tortuga (Gerschenfeld y Piccolino, 1977).

Sin embargo, muchos de estos resultados se contraponen a los obtenidos utilizando otras técnicas. Así, además de que la AC parece no estar presente en las capas retinales externas (Neal, 1976; 1983), Lam (1975) ha demostrado que la enzima sintetizadora de la AC no se encuentra en concentraciones suficientes en los fotorreceptores de retina de tortuga. Por otra parte, Raughman y cols. (1978) demostraron que la colina, un precursor importante en la síntesis de AC, no es tomada por las terminales sinépticas localizadas en la capa plexiforme externa. Además existen evidencias que indican que la AC no tiene efectos electrofisiológicos directos consistentes sobre las células horizontales de la retina de pez (Nurakami *et al* 1972) y que concentraciones altas de atropina, aún cuando bloquea la señal entre los conos y las células horizontales, no modifica el

potencial de las células bipolares "hiperpolarizantes" en retina de tortuga (Piccolino y Gershenfeld, 1977). Aunque esta serie de resultados hacen dudar acerca del posible papel transmisor de la AC en los fotorreceptores no debe descartarse definitivamente tal posibilidad.

TABLA 1

Posibles neurotransmisores de los diferentes tipos neuronales de la retina de los vertebrados

| Transmisor | Neurona presináptica (Liberadora del transmisor) | Neurona postsináptica (Receptora del transmisor) |
|--------------------------------|--|---|
| Acetilcolina | Célula amacrina Fotorreceptor (?) Célula bipolar (?) | Ganglionar Amacrina |
| Dopamina | Interplexiformes Amacrina | Horizontal Bipolar Amacrina |
| GABA | Horizontal Amacrina | Bipolar Fotorreceptor Bipolar Amacrina Ganglionar |
| Ac. Glutámico Ac. Aspártico | Fotorreceptor Bipolar (?) Amacrina (?) Ganglionares | Horizontal Bipolar |
| Glicina | Amacrina | Amacrina Ganglionar |
| Serotonina | Amacrina | Bipolar Amacrina |
| Péptidos neuronales | Amacrinas Ganglionares | Amacrinas Ganglionares |
| Taurina | Amacrina (?) Fotorreceptor (?) | |

4.1.2. Glutamato y Aspartato

En contraposición a lo observado para la AC, las evidencias que apoyan el papel transmisor de los aminoácidos glutámico y aspártico en los fotorreceptores están más fundamentadas y en la actualidad se les considera como los candidatos más firmes para desempeñar dicha función (Morgan, 1983). Sin embargo, la caracterización de éstos como transmisores en la retina se ha visto limitada por la incapacidad de identificar enzimas específicas útiles como trazadores, así como la falta de estrategias efectivas para la inactivación funcional de ambos aminoácidos y la imposibilidad de discriminar los efectos fisiológicos y bioquímicos entre el glutamato y el aspártato.

Tanto el ácido glutámico como el ácido aspártico están presentes en concentraciones altas en la retina (Pasantes-Morales et al, 1972) principalmente en las capas más externas (Kennedy y Voaden, 1974). Se ha demostrado para ambos compuestos un sistema de captación de alta afinidad dependiente de sodio en retinas completas de rata (White y Neal, 1976) y en fracciones subcelulares de retina de pollo (Thomas y Redburn, 1978); en gatos, monos y humanos el glutamato es acumulado por los bastones pero no por los conos (Bruun y Ehinger, 1974) y en peces teleosteos los bastones acumulan exclusivamente ácido glutámico, los conos sensibles al rojo y al verde captan tanto ácido glutámico como aspártico, mientras que los conos sensibles al azul carecen de sistemas de transporte de alta afinidad para ambos aminoácidos (Mand y Lam, 1981a).

Por otra parte, los estudios bioquímicos indican la presencia de receptores postsinápticos específicos para los

aminoácidos excitadores en membranas postsinápticas a los fotorreceptores. Se han caracterizado farmacológicamente los sitios de unión específica para el glutamato y el aspartato en membranas de fracción subcelular P₁, correspondientes a las membranas asociadas a las terminales de los fotorreceptores, en retinas de bovino (Hockel y Müller, 1982). López-Colomé (1981) y López-Colomé y Somohano (1982) caracterizaron los receptores sinápticos para el aspartato y el glutamato en membranas de ambas capas plexiformes en la retina del pollo. Más adelante (López-Colomé y Somohano, 1984), utilizando un modelo de degeneración por kainato, sugirieron la existencia de una distribución diferencial de receptores sinápticos para el glutamato y el aspartato en los diferentes tipos neuronales de la retina, incluyendo las células horizontales y bipolares. Por su parte, Mitchell y Redburn (1982) demostraron dos sitios de unión al receptor para el ácido glutámico y uno para el ácido aspártico en membranas aisladas de retina de bovino; uno de los sitios para el glutamato, presentó las mismas características farmacológicas que el receptor único detectado electrofisiológicamente en células bipolares "despolarizantes" (Slaughter y Miller, 1981).

En otra serie de experimentos, Neal y cols. (1979) han demostrado, utilizando un sistema de superfusión, que la liberación de aspartato endógeno en retinas de conejo se interrumpe cuando éstas se someten a iluminación. Por otra parte, Yazulla y Fleinschmidt (1980) han sugerido que el glutamato podría funcionar como transmisor de los bastones y el aspartato de los conos a partir de experimentos de degeneración con kainato en retinas de carpa. Esta idea coincide con el hecho de

que la enzima aspartato aminotransferasa, responsable de la síntesis del aspartato, ha sido localizada en conos de cobayo y de mono mediante técnicas inmunohistoquímicas (Mosinger y Altschuler, 1982).

Las evidencias electrofisiológicas directas indican que ambos aminoácidos tienen efectos fisiológicos de carácter eléctrico sobre células de segundo orden idénticos a los producidos por el transmisor natural del fotorreceptor: tanto el ácido glutámico como el ácido aspártico en el medio de incubación o administrados iontoforéticamente producen una despolarización de las células horizontales y bipolares "hiperpolarizantes" en retinas de tortuga (Cervetto y MacNichol, 1972) peces teleosteos (Murakami *et al.*, 1972) y elasmobranchios (Dowling y Ripps, 1972), mientras que las células bipolares "despolarizantes" sufren una hiperpolarización en retinas de carpa (Cervetto y Shimazaki, 1978). En todos los casos, tales cambios en la polaridad de la célula son reversibles y siempre van acompañados de modificaciones en la conductancia de la membrana (Werblin, 1979). Por otra parte se ha desechado un posible efecto presináptico de los aminoácidos aplicados debido a que el bloqueo de la liberación del transmisor endógeno en un medio sin calcio no modifica la acción del ácido glutámico y el ácido aspártico (Gerschenfeld y Piccolino, 1979).

Finalmente, se ha demostrado que algunos analogos de estos aminoácidos se comportan de la misma manera en la retina y en otras áreas del SNC donde existen suficientes evidencias acerca del papel transmisor de los ácidos glutámico y aspártico. El ácido kainico, que es un analogo estructural del glutámico despolariza las células horizontales e hiperpolariza las células

bipolares "depolarizantes" incrementando la resistencia de la membrana en retina de pez (Shiells *et al.*, 1981). De la misma manera el ácido β -amino 4 fosfoacético se comporta como un agonista del ácido glutámico al hiperpolarizar las células bipolares "depolarizantes" (Shiells *et al.*, 1981; Slaughter y Miller, 1981). Por otra parte, el ácido alfa-aminoadipico un antagonista del aspartato bloquea los efectos del ácido L-aspartico aplicado exógenamente, así como los del transmisor liberado por los conos sobre las células horizontales (Wu y Dowling, 1978).

4.2. Transmisores de las células horizontales

A pesar de conocerse ampliamente la electrofisiología y morfología de las células horizontales, se sabe muy poco acerca del transmisor utilizado por éstas. El candidato único propuesto para tal función es el ácido γ -amino butírico (GABA) de acuerdo fundamentalmente a las evidencias de tipo histoquímico (Yazulla, 1986). Este aminoácido se encuentra presente en las retinas de todos los vertebrados y sus niveles se modifican durante la adaptación a la oscuridad (Graham *et al.*, 1976). Además, se ha demostrado la existencia de receptores sinápticos específicos para el GABA asociados a la capa plexiforme externa en retinas de una amplia variedad de vertebrados (Schaeffer, 1980; Yazulla y Brecha, 1980). Por otra parte, se ha detectado en la retina la presencia de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), responsable de la síntesis del GABA y su localización coincide con la de las células que acumulan el GABA exógeno tanto en las capas externas como en las internas de la retina (Lam *et al.*,

1979). Recientemente, Brandon et al (1980a) detectaron por técnicas inmunocitoquímicas la presencia de GAD en algunas células horizontales de retina de rana. Resultados semejantes fueron obtenidos por Lam y cols. (1980a), quienes localizaron en retinas de peces, mediante autorradiografía e inmunohistoquímica, una subpoblación de células horizontales, denominadas H1, capaces de sintetizar y acumular GABA. Por otra parte, se ha medido la liberación estimulada de GABA en células horizontales de retinas de peces y anfibios utilizando técnicas de autorradiografía (Marc et al., 1978; Yazulla y Kleinschmidt, 1981) y de degeneración específica en sistemas de superfusión (Schwartz, 1982). Además, la presencia de este aminoácido y de sus antagonistas alteran la función retiniana (Vorkel y Hanitzsch, 1971; Graham y Pong, 1972) y se ha propuesto un efecto postsináptico del GABA liberado por las células horizontales sobre la terminal de los conos (Lam et al., 1978; Wu y Bowling, 1978). La totalidad de evidencias mencionadas anteriormente, en especial las histoquímicas, indican que sólo una población de las células horizontales son GABAérgicas y en la actualidad se carece de información acerca de los posibles transmisores utilizados por el resto de las células horizontales.

4.3. Transmisores de las células bipolares

La identidad del transmisor liberado por las células bipolares aún no se conoce y los posibles candidatos carecen de evidencias suficientemente firmes. El GABA se ha sugerido como un posible transmisor debido a que es tomado por algunas células bipolares (Marc et al 1978); sin embargo, no existen otras pruebas que

apoyen dicha posibilidad.

4.3.1. Acetilcolina

La acetilcolina (AC) podría ser usada por algunas células bipolares dado que su aplicación iontoforética excita las células ganglionares "sostenidas" en retina de conejo (Masland y Ames, 1976) y regula su disparo espontáneo en retina de gato (Ikeda y Sheardown, 1982b); esta consideración se basa en evidencias que indican que dichas células ganglionares con respuesta sostenida reciben contactos directos de las células bipolares sin intervención de las células amacrinas (Miller, 1979). Sin embargo, Glickman *et al* (1982) no observaron respuestas de las células ganglionares "sostenidas" al administrar AC y su agonista carbamilcolina en retina de carpa.

Por otra parte, la acetil-colintransferasa y la colinesterasa, responsables de la síntesis y degradación de la AC, se concentran en la capa plexiforme interna de retina de ratón (Ross *et al*, 1976) y existe un sistema de captación de alta afinidad para la colina asociado a la síntesis de AC en células bipolares de pollo (Baughman y Sager, 1977). Sin embargo, las células bipolares de conejo no acumulan colina exógena (Masland y Mills, 1979), mientras que en retinas de pichón las células bipolares carecen de la enzima acetilcolinesterasa y no son capaces de acumular colina- HP en la capa plexiforme externa, donde se localizan las dendritas de estas células (Nichols y Koelle, 1968). Asimismo, se han localizado receptores sinápticos nicotínicos y muscarínicos para la AC en la capa plexiforme interna (Sugiyama *et al*, 1977; Yazulla y Schmidt, 1977).

Aunque es difícil determinar si algunos de estos parámetros corresponden a las células amacrinas o bipolares, es probable que exista una población de células bipolares colinérgicas, cuya proporción difiera cuantitativamente dependiendo de la especie analizada.

4.3.2. Aminocidos excitadores

Otros compuestos que cuentan con evidencias fuertes para funcionar como neurotransmisores de las células bipolares son los aminoácidos glutámico y aspártico. Se han analizado los sitios de unión al receptor postsináptico para el ácido glutámico en retinas de diferentes especies y se han encontrado concentrados en las fracciones subcelulares P₁ y P₂ de retina de pollo (López-Colomé, 1981; López-Colomé y Somchano, 1982) y en la capa plexiforme interna de retinas de bovino (Mitchell y Redburn, 1982; Hockel y Müller, 1982). Resultados similares se han obtenido para el aspártato (López-Colomé, 1981; López-Colomé y Somchano, 1982; Mitchell y Redburn, 1982) y en todos los casos se ha comprobado su especificidad mediante el uso de desplazadores selectivos para cada uno de los aminoácidos. Además, se ha caracterizado un sistema de captación de alta afinidad dependiente de sodio tanto para el ácido aspártico como para el ácido glutámico en retinas de rata (White y Neal, 1976) así como en fracciones subcelulares P₁ y P₂ de retina de bovino (Thomas y Redburn, 1978; Hockel y Müller, 1982).

Los estudios de degeneración con ácido kainico, un potente neurotóxico que actúa posiblemente a través de receptores localizados sobre neuronas glutamoceptivas (Coyle, et al., 1978),

han demostrado la existencia de neuronas sensibles a este fármaco en la capa plexiforme interna de la retina, observándose particularmente una degeneración en los somas y dendritas de las células ganglionares en el conejo (Hampton *et al.*, 1981) y algunas células amacrinas en el pollo (López-Colomé y Somohano, 1984). Utilizando el mismo modelo de degeneración por reinato, López-Colomé y Somohano (1986) han sugerido que el transmisor empleado por las células bipolares "encendidas" podría ser el aspartato, mientras que el de las bipolares "apagadas" sería el glutamato.

Por otra parte, la aplicación iontoforética de L-aspartato produce un incremento en la excitación de células ganglionares "sostenidas" en retina de gato y dicha excitación es bloqueada por el ácido 2-aminó-3-fosfonovalérico, que es un fuerte antagonista del ácido aspártico en otras áreas del SNC. La aplicación del ácido glutámico produce respuestas variables y menos claras, pero al igual que en el caso del aspartato, estas se observan únicamente en células ganglionares "sostenidas" (Ikeda y Sheardown, 1981 y 1982a), las cuales reciben información sináptica exclusivamente de células bipolares.

4.4. Transmisores de las células amacrinas

4.4.1. GABA

Las células amacrinas parecen poseer la mayor diversidad de transmisores, los cuales se asocian a diferentes subpoblaciones de estas células. Entre los compuestos mencionados como posibles transmisores de las células amacrinas se encuentra el GABA. Los ensayos de autoradiografía han demostrado que el GABA marcado es

tomado tanto por células de las capas externas así como por una subpoblación de células amacrinas de retinas de varias especies (Ehinger y Falck, 1971; Brandon et al., 1979). En la carpa dorada, el GABA-HR es acumulado por las células amacrinas piriformes las cuales son morfológicamente similares a las células amacrinas "sostenidas" que responden despolarizándose con la luz roja (Marc et al., 1978). Estas células probablemente son postsinápticas a las células bipolares y en muchos casos pueden realizar contactos presinápticos sobre la misma célula bipolar. En el gato se han detectado 4 tipos de células amacrinas que se marcan en presencia de GABA-HR; sin embargo, dos de estos tipos celulares acumulan GABA radiactivo en una proporción muy baja (Pourcho, 1981), lo que sugiere la mediación de un mecanismo de captación de baja afinidad no relacionado con el sistema de la neurotransmisión (Ehinger, 1982).

En la mayoría de los ensayos, la acumulación de GABA coincide con la localización de células GABAérgicas obtenida por el uso de anticuerpos contra la enzima sintetizadora de este aminoácido, la GAD, en retinas de peces (Lam et al., 1979) anfibios y mamíferos (Brandon et al., 1979; 1980). La mayoría de las células amacrinas que contienen GAD, en retinas de rata, realizan contactos pre y postsinápticos con células bipolares; asimismo, estas células reciben entradas sinápticas, en una menor proporción de otras células amacrinas GABAérgicas y envían prolongaciones a células ganglionares y a otras células amacrinas no marcadas (Vaughn et al., 1981). En retinas de conejo, las conexiones de dichas células amacrinas son muy similares, aunque existe una menor información al respecto (Brandon et al., 1980).

La acumulación de GABA se ha asociado a un sistema de transporte dependiente de sodio y de temperatura con base en los estudios realizados en retinas de vertebrados (Goodchild y Neal, 1973).

Además se han localizado receptores postsinápticos específicos para este aminoácido en la capa plexiforme interna de retinas de conejo y de bovino (Redburn y Mitchell, 1981). Asimismo, Maddy y Neal (1978) demostraron que la liberación de acetilcolina- H^+ inducida por luz se inhibe en presencia de GABA, lo que sugiere la presencia de receptores GABAérgicos sobre algunas células colinérgicas.

Se ha demostrado electrofisiológicamente en retinas de conejo que la Picrotoxina, que es un bloqueador de los receptores del GABA, inhibe las respuestas de las células ganglionares asociadas a la direccionalidad del estímulo (Wyatt y Law, 1976). Asimismo, el GABA inhibe las respuestas inducidas por iluminación en las células ganglionares de retina de carpa (Glickman et al., 1982), habiéndose propuesto que dicho aminoácido media la inhibición de las células ganglionares de centro "encendido" en retina de gato (Ikeda y Sheardown, 1982c).

4.4.2. Glicina

Otro posible transmisor de las células amacrinas es la glicina. A diferencia de lo observado para las células GABAérgicas en la retina, no existen estudios inmunohistoquímicos que muestren la localización de neuronas glicinérgicas en este tejido debido a la falta de información acerca de la ruta de síntesis de este aminoácido como transmisor.

Una serie de estudios bioquímicos han demostrado que este

aminoácido se acumula en las células amacrinas de retina de carpa (Marc y Lam, 1981b; Marc et al., 1978), rana (Voaden et al., 1974) y de mamíferos (Brunn y Ehinger, 1974; Lam y Hollyfield, 1980; Fournco, 1980; Ehinger y Falck, 1971). Además, en retinas de gato, las células que acumulan glicina-H⁺, identificadas como células amacrinas A11 (Fournco, 1981), establecen sinapsis recíprocas con neuronas dopaminérgicas y son postsinápticas a las células bipolares y presinápticas a las células ganglionares (Kolb, 1979). En retinas de carpa, las células amacrinas glicinérgicas, Aa, poseen una organización sináptica similar: estas células reducen la acumulación de glicina-H⁺ en presencia de luz roja, por lo que se ha sugerido que corresponden a las células amacrinas "hiperpolarizantes sostenidas" que responden al rojo (Marc y Lam, 1981b).

Se ha demostrado que la glicina endógena o administrada exógenamente se libera de la retina de una gran variedad de especies por acción directa de la luz o en presencia de diferentes agentes depolarizantes (Lam y Hollyfield, 1980; López-Colomé et al., 1978). Por otra parte, algunas evidencias electrofisiológicas indican que la glicina es capaz de hiperpolarizar ciertas células ganglionares, particularmente las ganglionares "transitorias" de centro "apagado" (Ikeda y Sheardown, 1982c).

4.4.3. Taurina

Se ha considerado la posibilidad de que el aminoácido taurina sea neurotransmisor de ciertas células amacrinas (Mandel et al., 1976) debido a que es acumulado por los somas de algunas de estas

celulas en retinas de aves, mamíferos y anfibios (Voaden *et al.*, 1977; Lake *et al.*, 1978). Además, se ha detectado en la retina la presencia de la enzima que sintetiza la taurina, la descarboxilasa del ácido cistein-sulfínico (Mandel *et al.*, 1976), así como niveles endógenos elevados de este aminoácido en todas las capas retinianas (Orr *et al.*, 1976). Por otra parte, se ha demostrado un mecanismo de captación de alta afinidad en retinas de diferentes especies (Starr, 1978; Lawson y Neal, 1984), así como liberación ante estimulación eléctrica o por la acción de agentes despolarizantes (López-Colomé *et al.*, 1978; Starr, 1978; Pasantes-Moraes *et al.*, 1981). Los estudios electrofisiológicos han demostrado que este aminoácido deprime al electroretinograma (Pasantes-Moraes *et al.*, 1971) y afecta la actividad de las células bipolares y ganglionares (Bunningham y Miller, 1980).

Cabe mencionar, sin embargo, que muchos de los efectos electrofisiológicos son bloqueados por la estricnina y que tanto la taurina como enzima que la sintetizan están concentradas en las capas más externas de la retina. Además, hasta el momento no ha sido posible demostrar la presencia de receptores sinápticos en ninguna capa de la retina; por ello se ha sugerido que el papel de la taurina en la retina no sea el de neurotransmisor (Pasantes-Moraes, 1986). Se volverá sobre algunos de estos aspectos en algunas de las secciones siguientes.

4.4.4. Acetilcolina

Se sabe que la acetilcolina estimula algunas células ganglionares (Straschill, 1968; Ames y Pollen, 1969), por lo que se cree que podría funcionar como transmisor de ciertas células amacrinas.

Así, se sabe que la actividad espontánea de algunas células ganglionares aumenta cuando se introduce un inhibidor de la acetilcolinesterasa en la circulación de la retina (Ariel y Daw, 1981). Además, la aplicación iontóforética de acetilcolina y de algunos de sus agonistas y antagonistas en la capa plexiforme interna afecta el comportamiento de las células ganglionares "sostenidas" de centro "encendido" en conejo (Masland y Ames, 1976) y de las células ganglionares "transitorias" en carpa (Glickman et al., 1982) y gato (Vilada y Sheardown, 1982b).

Por otra parte, las enzimas responsables de la síntesis y degradación de ACh se concentran en la capa plexiforme interna, básicamente en los somas de las células amacrinas y ganglionares (Nichols y Koelle, 1968; Ross et al., 1975); existe un sistema de captación de colina asociado a la síntesis de ACh en células amacrinas de pollo (Baughman y Bader, 1977), de conejo (Masland y Mills, 1979) y de peces (Vivas y Bruban, 1980); la acetilcolina se libera por un mecanismo dependiente de calcio en presencia de alto potasio (Baughman y Bader, 1977) o por acción de la luz (Massey y Neal, 1970; 1982), esta última se bloquea por GABA y se potencia en presencia de los antagonistas de este aminoácido (Massey y Neal, 1978; 1982).

Además, se han caracterizado receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos asociados a la capa plexiforme interna (Sugiyama et al., 1977; Yazulla y Schmidt, 1977), habiéndose sugerido que los receptores nicotínicos son postsinápticos a las células amacrinas (Vogel et al., 1977), particularmente cuando establecen sinapsis con células ganglionares en retinas de pollo (Morgan y Mundy, 1982) o cuando conectan con otras células

amacrinas en retinas de rata (Pourcho, 1979), mientras que ambos tipos de receptores están involucrados en interacciones entre células bipolares y amacrinas en la retina de pollo.

Los resultados obtenidos mediante estudios autorradiográficos (Baughman y Bader, 1977; MacLund y Mills, 1979) sugieren que existen dos subpoblaciones de células amacrinas colinérgicas: una de estas se localiza en la capa de las células amacrinas y sus procesos se extienden a la lámina 2 de la capa plexiforme interna, mientras que los soma de la segunda subpoblación se sitúan entre las células ganglionares y sus prolongaciones alcanzan la lámina 4 de la misma capa plexiforme. Las diferencias en la distribución de ambos tipos celulares también reflejan distintas respuestas funcionales (Ehinger, 1982).

4.4.5. Dopamina

La dopamina representa la principal catecolamina en la retina de los vertebrados y mediante el uso de técnicas inmunofluorescentes y autorradiográficas se han identificado células amacrinas dopaminérgicas (Ehinger y Falck, 1971; Ehinger, 1983). Estas células constituyen entre el 5% y el 10% del total de las neuronas que poseen prolongaciones en la capa plexiforme interna (Ehinger, 1976) y se han catalogado como células interamacrinas, puesto que sus procesos conectan únicamente con neuronas de este tipo en la capa plexiforme interna (Dowling y Ehinger, 1978b).

Frederick y cols. (1982) demostraron la acumulación de dopamina- H^3 en células interamacrinas de retina de humanos: éstas poseen una alta concentración de dopamina; un sistema de alta

afinidad dependiente de sodio para esta catecolamina; y un mecanismo de liberación estimulada dependiente de calcio para la dopamina endógena o administrada exógenamente.

Además, se han identificado las enzimas que sintetizan y degradan este compuesto, así como un sistema de captación de alta afinidad y de receptores sinápticos específicos (Ehinger, 1983). Se ha propuesto que estas células amacrinas dopaminérgicas extienden sus prolongaciones ampliamente, sin conectar con las células bipolares o ganglionares, sino únicamente con otras células amacrinas. Parece ser que estas células amacrinas son al menos de dos tipos: GABAérgicas y glicinérgicas (Ehinger, 1983).

4.4.6. Otros candidatos

Otros compuestos mencionados como posibles neurotransmisores de las células amacrinas, de acuerdo a estudios bioquímicos y electrofisiológicos son: la noradrenalina (Osborne, 1981); la serotonina (Fiorán y Harrison, 1980); y algunos neuropeptidos como: la somatostatina (Brecha *et al.*, 1981); sustancia P (Dick *et al.*, 1980); encefalinas (Dick *et al.*, 1980); hormona liberadora de la tirotrona (TRH) (Eurt, 1979); neurotensina (Brecha *et al.*, 1981) y el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP) (Stell *et al.*, 1980), entre otros. En términos generales, los neuropeptidos se localizan en el área más interna de la capa nuclear interna de las retinas estudiadas (Ehinger, 1982).

4.5. Transmisores de las células interplexiformes

Se cree que, al menos en el caso de peces y monos del Nuevo Mundo, las células interplexiformes II, descritas por Dowling y Ehinger (1975, 1978a), son de naturaleza dopaminérgica en base a

los estudios de microscopia fluorescente (Dowling y Ehinger, 1978a; 1978b; Ehinger, 1983) y autorradiográficos (Hendrickson et al, 1981). En otras especies no se ha detectado un número significativo de fibras dopaminérgicas correspondientes a las células interplexiformes, aunque en algunas ocasiones se ha identificado la presencia de un número reducido de fibras dopaminérgicas cortas en la capa plexiforme externa de retinas de ratón, rata y conejo (Ehinger, 1983).

Se ha sugerido que estas células poseen sistemas de acumulación y liberación de dopamina (Frederick et al, 1982); además se ha observado un efecto dopaminérgico en la actividad intracelular de las neuronas que conectan con las células interplexiformes en la capa plexiforme interna: la aplicación iontoforética de dopamina en retinas de carpa produce una despolarización de las células horizontales, así como una hiperpolarización de las neuronas bipolares "depolarizantes" y una alteración en la amplitud del potencial de los conos (Hedden y Dowling, 1978).

Los estudios autorradiográficos realizados en retina de carpa, sugieren la existencia de otro tipo de células interplexiformes denominadas II capaces de acumular y liberar glicina $-H^2$ en presencia de alto potasio y en una forma dependiente de calcio (Marc y Lam, 1981b). En la capa plexiforme externa estas células parecen ser postsinápticas a los somas de células GABAérgicas HI y presinápticas a las dendritas de un tipo de células horizontales no identificadas, mientras que sus conexiones en la capa interna no se conoce (Marc y Lam 1981b).

Finalmente, se ha sugerido que el GABA podría ser el

transmisor de algunas células interplexiformes. de acuerdo a los estudios autorradiográficos con GABA-HP y su análogo muscimol-HP (Nakamura et al., 1980; Pournho, 1981); dichas neuronas solo reciben entradas sinápticas de células amacrinas y células bipolares en la capa plexiforme interna, mientras que en la capa plexiforme externa son presinápticas a las dendritas de las células bipolares que conectan con los bastones y, menos frecuentemente, a las células bipolares conectadas con los conos.

II. RELACIONES FUNCIONALES EN LA RETINA: OBJETIVOS DEL ESTUDIO

En la actualidad existen pocas dudas acerca de las ventajas que posee la retina sobre otras áreas del SNC en términos de su disponibilidad para la investigación de la actividad nerviosa. Los estudios de neuroanatomía, organización sináptica y electrofisiología en este tejido se encuentran más avanzados que en la mayoría de las áreas del cerebro. Esto ha permitido mayores logros en los campos de la neuroquímica y neurofisiología en la retina que en el resto del SNC. Sin embargo, uno de los principales problemas del estudio de la actividad neuronal de la retina ha sido la multiplicidad de subpoblaciones celulares que se refleja en una abundancia de transmisores. Esto ha dificultado el conocimiento de las conexiones funcionales entre las diversas subpoblaciones que operan en la retina.

Es necesario, por lo tanto, abordar el problema de la interrelación funcional de estas subpoblaciones neuronales utilizando diferentes estrategias experimentales. En este trabajo se hizo uso de enfoques bioquímicos e histológicos para contribuir al conocimiento del papel que juegan algunos compuestos neuroactivos en la retina y en la forma en la que están relacionados los sistemas neuronales que manejan estos compuestos como neurotransmisores.

Los resultados obtenidos a partir de esta serie de estudios se analizarán en las secciones siguientes.

Primeramente se discutirá la posibilidad de que el aminoácido taurina no esté involucrado directamente en la retina como neurotransmisor, con base en los resultados obtenidos mediante la manipulación farmacológica del proceso de liberación de taurina

en la retina como respuesta a la estimulación luminosa (secc. II.2.1).

Más adelante (secc. II.2.2. y II.2.3.) se analizarán los resultados de los estudios relacionados con la interacción de neuronas aminoacidérgicas en la retina de los vertebrados. Por una parte, se mostrarán los resultados de la relación de neuronas aminoacidérgicas y neuronas GABAérgicas en tres especies de vertebrados (secc. II.2.2.). Por otra parte, se explorará la relación existente entre neuronas glutamatérgicas y aspartatérgicas con neuronas dopaminérgicas en la retina de pollo utilizando un enfoque bioquímico con la finalidad de corroborar los estudios previos presentados por otros autores en peces y mamíferos (secc. II.2.3.).

Con la finalidad de tener un panorama más amplio y completo sobre la interacción de los sistemas aminoacidérgicos en la retina y considerando que algunos de los parámetros funcionales de ciertos sistemas de neurotransmisores se modifican durante los procesos de maduración, se presentarán y discutirán los resultados de los estudios relacionados con la interacción de las neuronas excitadoras con los sistemas GABAérgicos (secc. II.2.4.4.) y dopaminérgicos (secc. II.2.4.5.) a lo largo del desarrollo de la retina en dos diferentes especies.

1.METODOLOGIA GENERAL

La metodología utilizada a lo largo de los trabajos aquí presentados se basa principalmente en ensayos de superfusión de retinas de diferentes especies o bien de fracciones subcelulares previamente incubadas con los diferentes compuestos radioactivos. Una vez lavadas las retinas, se colocan en cámaras de vidrio de 0.25 ml. de capacidad conectadas mediante mangueras de plástico, a una bomba peristáltica que impulsa el medio fisiológico que baña el tejido y que puede contener los distintos agentes despolarizantes o agonistas y antagonistas de los neurotransmisores. El compuesto radioactivo liberado por el tejido espontáneamente o bajo estimulación, se recoge en viales colocados en cada cámara y se cuantifica el contenido de radioactividad.

En algunos casos se estudió autorradiográficamente la localización de algunos de los aminoácidos en las retinas tanto antes como después de la acción de los distintos agentes despolarizantes. En este caso, el tejido se fija en glutaraldehído y se procesa siguiendo el protocolo de muestras para microscopía electrónica. Los cortes se cubrieron con emulsión fotosensible y se revelaron después de 2 a 6 semanas.

En todos los estudios se comprobó cromatográficamente que el compuesto radioactivo usado originalmente no se degradara o sufriera alguna alteración metabólica. Asimismo, en casi todos los ensayos se utilizaron bloqueadores de la actividad de las enzimas que metabolizan los distintos compuestos empleados.

En cada uno de los trabajos presentados se detallará la metodología específica.

2. RESULTADOS

Los resultados que aquí se presentan están basados principalmente en los trabajos que a continuación se enumeran:

- 1.-Salazar P, Quesada O, Campomanes MA, Morán J, y Pasantes-Morales H (1986): Pharmacological identification of retinal cells releasing taurine by light-stimulation. *J. Neurosci. Res.* 19: 383-391.
- 2.-Morán J, Pasantes-Morales H y Redburn DA (1986) : Glutamate receptor agonists release GABA preferentially from horizontal cells. *Brain Res.* 393: 276-287.
- 3.-Morán J, Pasantes-Morales H y Redburn DA : Stimulatory effect of kainic and glutamic acid on 3H-GABA release from developing rabbit retina. Somatido para su publicación en *Dev. Neurosci.* (1986).

Ademas de estos resultados se incluyen, en la ultima seccion, una serie de datos que se publicaran bajo el titulo de : Effect of excitatory amino acids on 3H-dopamine release from chick embryo retina.

2.1. Papel de la taurina en la retina

2.1.1. Introducción y antecedentes

La taurina es un aminoácido que no forma parte de proteínas y la única reacción metabólica en la que participa es la conjugación con los ácidos biliares (Hoffmann y Small, 1967).

Este aminoácido se encuentra como aminoácido libre en casi todos los tejidos de los vertebrados estudiados (Jacobsen y Smith, 1968), siendo el cerebro, corazón, glándulas

secretoras, hígado, riñón, plaquetas y linfocitos donde se detectan las concentraciones más altas.

Algunas de las acciones fisiológicas y farmacológicas de la taurina incluyen: una acción anticonvulsinante en modelos de epilepsias agudas y crónicas (Van Gelder, 1978; una acción antiarrítmica en arritmias producidas por epinefrina y digitalidos, así como un efecto inotrópico positivo en el corazón (Dolara et al., 1970). Además, se ha sugerido una relación directa entre este aminoácido y los mecanismos que regulan la temperatura, el dolor y el tono muscular (Lipton y Tickner, 1979). Por otra parte, la taurina induce modificaciones en el metabolismo de la glucosa (Kulakowski et al., 1984), modifica los flujos iónicos (Pazantes-Morales et al., 1982), y en vertebrados parece estar involucrada en procesos osmorreguladores, actuando junto con otros aminoácidos como efector osmótico (Vidali, 1983).

La taurina ha sido postulada como candidato a neurotransmisor en el sistema nervioso a partir de sus efectos inhibitorios en muchas áreas del SNC. Sin embargo, existen algunas dudas al respecto dada la inconsistencia y contradicción de muchos de los resultados experimentales obtenidos. Uno de los principales obstáculos para el estudio de la taurina como neurotransmisor es la falta de agonistas y antagonistas sinápticos específicos, así como de inhibidores específicos en la vía de síntesis de este aminoácido.

Los criterios para definir un compuesto como neurotransmisor son los siguientes: 1) la presencia en la terminal nerviosa del compuesto y de las enzimas de su síntesis; 2) una acción

fisiológica idéntica entre la producida por el candidato y la inducida por el compuesto endógeno, esto incluye efectos idénticos en la permeabilidad iónica e igual susceptibilidad farmacológica; 3) liberación del compuesto de la terminal nerviosa bajo estimulación; y 4) inactivación del compuesto endógeno del espacio sináptico por mecanismos de degradación enzimática o de captura de alta afinidad.

Una de las áreas del SNC donde se ha considerado la posibilidad de que la taurina funcione como neurotransmisor inhibitor es la retina. A continuación se mencionarán algunos de los resultados obtenidos en los estudios relacionados con el posible papel transmisor de la taurina en la retina.

La retina posee concentraciones elevadas de taurina que varían de 10 a 50 $\mu\text{mol}/\text{g}$ de peso húmedo dependiendo de la especie (Pasantes-Morales, 1986). La distribución intrarretinal de éste aminoácido varía marcadamente en las diferentes capas retinales, siendo los fotorreceptores los que contienen la mayor cantidad de taurina (Orr et al., 1976). Además, la enzima reguladora de la síntesis de taurina se encuentra presente en prácticamente todos los tipos neuronales de las capas retinales internas, lo que sugiere una actividad general del aminoácido más que como neurotransmisor.

Como se menciona en la sección 1.4.4.3., la taurina tiene algunos efectos eléctricos sobre las células de la retina. Cunningham y Miller (1976) examinaron el efecto de este aminoácido en la retina de conejo y encontraron que la taurina bloqueó completamente la respuesta inducida por iluminación de las células ganglionares del centro "apagado", así como la

actividad espontánea de todas las células ganglionares. En un estudio subsiguiente, utilizando retina de Necturus (Cunningham y Miller, 1980), encontraron que la taurina bloqueó la respuesta de las células bipolares "hiperpolarizantes", así como la actividad espontánea de las células ganglionares y la inducida por luz en células amacrinas. Cabe señalar, sin embargo, que en estos estudios la glicina tuvo efectos casi idénticos y las respuestas de ambos aminoácidos se bloquearon en presencia de estricnina, un antagonista específico de los receptores sinápticos de la glicina. Estos resultados son similares a los observados en otras áreas del SNC, como la médula espinal, el talamo y la corteza cerebral, donde los efectos inhibitorios de la taurina se bloquean en presencia de estricnina y bicuculina, antagonistas de la glicina y el GABA respectivamente (Muntz et al., 1971).

La retina posee un mecanismo de transporte para la taurina que es saturable, dependiente de temperatura y de gradientes de sodio con dos componentes de alta afinidad (Starr, 1978). Este transporte es inhibido solo por análogos estructurales como la beta-alanina, hipotaurina y guanidino etano sulfonato, sin afectarse sustancialmente en presencia de GABA o glicina, lo que indica que dicho proceso es altamente específico. Los estudios autorradiográficos (Voaden et al., 1981) muestran que en todas las especies los sitios de acumulación preferente son los fotorreceptores; en algunas especies como la rana y el pollo, las células bipolares y amacrinas también acumulan taurina.

La taurina se libera de la retina bajo diferentes condiciones experimentales. Se ha observado que en retinas de pollo, rata y rana la liberación espontánea de taurina se

incrementa marcadamente en presencia de agentes despolarizantes como la veratrina, ouabaina y glutamato, así como de ionóforos de sodio y calcio (Lopez-Colome et al., 1978; Kennedy y Voaden, 1976). En la mayoría de estos estudios, sin embargo, no se pudo demostrar claramente una dependencia de calcio. Por otra parte bajo condiciones despolarizantes de potasio externo, la taurina no se liberó de retinas de rana y rata (Kennedy y Voaden, 1976; Pasantes-Morales, 1980).

Otra de las condiciones que induce la liberación de taurina en la retina es la estimulación luminosa. Esto fue demostrado primeramente en retinas de pollo (Pasantes-Morales et al., 1973) y más adelante en retinas de gato y rata (Schmidt, 1978). Pasantes-Morales y cols. (1981) demostraron que en retinas de pollo degeneradas con ácido kainico, la liberación de taurina no se disminuyó significativamente, suscribiendo que una gran parte del aminoácido liberado provenía de los fotorreceptores; sin embargo, no fue posible precisar la proporción de taurina liberada por otras neuronas de las capas internas no afectadas por el tratamiento con ácido kainico.

A partir de una larga serie de evidencias experimentales han surgido serias dudas acerca del posible papel neurotransmisor de la taurina en la retina. Aunque algunas de las evidencias no descartan dicha posibilidad para un número reducido de neuronas retinales, es muy probable que este aminoácido ejerza acciones alternativas en la función retiniana, básicamente en los fotorreceptores, donde este aminoácido no pueda funcionar como neurotransmisor.

La importancia fisiológica de la poza de taurina en los

fotorreceptores fue puesta de manifiesto a partir de los estudios de Hayes y cols. (1975), quienes demostraron que la ausencia de taurina en la dieta de los gatos ocasionaba una degeneración de los fotorreceptores que llevaba a la ceguera total. Esto ha sido interpretado en el sentido de que este aminoácido está íntimamente relacionado con los mecanismos responsables del mantenimiento de la estructura y función de los fotorreceptores.

2.1.2. Inespecificidad farmacológica de las células que liberan taurina por estimulación luminosa. Implicaciones con respecto a su relación con otras neuronas de la retina.

El objetivo general del estudio que a continuación se presenta es el de demostrar las interrelaciones funcionales en las neuronas que manejan taurina en la retina. Para ello se han empleado herramientas farmacológicas, con las cuales, al bloquear o activar receptores sinápticos específicos de neurotransmisores conocidos se modifican las respuestas de las neuronas de acuerdo a las conexiones funcionales que reciben normalmente.

Los resultados del trabajo que a continuación se muestra indican que el origen de la taurina liberada por acción de la luz corresponde muy probablemente a los fotorreceptores. Además esta liberación no es modulada por influencias transinápticas de la retina neural. Esto contrasta con lo observado para otros compuestos neurotransmisores como la acetilcolina, la dopamina y muchos de los aminoácidos transmisores (Cunningham y Neal, 1983; Morgan y Kamp, 1980). A partir de estos resultados se sugiere entonces que la liberación de taurina en la retina inducida por la luz está muy probablemente relacionada con una función

diferente a la de la neurotransmisión, dado que este aminoácido no puede ser transmisor de los fotorreceptores, los cuales se ha demostrado que utilizan un compuesto excitador como mensajero químico.

Pharmacological Identification of Retinal Cells Releasing Taurine by Light Stimulation

P. Salazar, O. Quesada, M.A. Campomanes, J. Morán, and H. Pasantés-Morales

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

The effect of drugs blocking synaptic activity at different retinal levels was examined in this study, in an attempt to identify the origin of the light-stimulated release of ^3H -taurine from the chick retina. It was determined by autoradiography that the chick retina accumulates taurine in photoreceptors, in cells from the inner nuclear layer, and in processes of the inner plexiform layer. All these are possible sites for the release of taurine upon illumination. To discriminate among these possibilities, the effects of aspartate, tetrodotoxin, strychnine, picrotoxin, chlorpromazine, tubocurarine, atropine, glutamate diethyl ester, α -amino adipate and 2-amino-4-phosphonobutyrate were studied. Aspartate (10 mM), which is known to eliminate the light response of cells postsynaptic to photoreceptors, induced a marked increase of 150% in the resting efflux of ^3H -taurine but did not decrease significantly the light-stimulated release. Tetrodotoxin, which blocks amacrine cell responses, decreased ^3H -taurine release stimulated by light by less than 20%. The efflux of taurine was unaffected by strychnine, picrotoxin, tubocurarine, atropine, chlorpromazine, and 2-amino-4-phosphonobutyrate, whereas it was increased by glutamate diethyl ester and α -amino adipate. These results, all together, point to photoreceptors as the cells releasing ^3H -taurine in response to light.

Key words: retina, taurine, light stimulation, taurine-releasing cells

INTRODUCTION

Taurine is present in large amounts in the vertebrate retina [Kubicek and Dolének, 1958; Pasantés-Morales et al, 1972]. It is found particularly concentrated in photoreceptors, although significant amounts are present throughout all retinal layers [Kennedy and Voaden, 1976; Orr et al, 1976]. The role for taurine in the retina has not been yet elucidated. Taurine has been proposed as an inhibitory neurotransmitter

Address reprint requests to Dr. Herminia Pasantés-Morales, Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-600, 04510, México D.F., México.

Received May 7, 1985; accepted November 22, 1985.

[Mandel et al, 1976], and evidence also exists which suggests its involvement in mechanisms preserving photoreceptor structure [Hayes et al, 1975; Pasantes-Morales et al, 1981a, 1983].

Light stimulation induces the release of taurine from the retina in a number of species [Pasantes-Morales et al, 1973; Schmidt, 1978; Neal et al, 1979]. The cellular and subcellular site from which the light-stimulated release of taurine occurs is unknown and its identification may represent a step in the elucidation of its functional role. The light-induced efflux of taurine may originate from photoreceptor cells, in which exogenously taken up taurine preferentially accumulates, or from cells in the inner retinal layers, which also accumulate taurine and which may function as taurinergic cells [Lake et al, 1978]. In order to investigate these possibilities, we have examined the effect of experimental conditions which are known to block synaptic transmission at different retinal levels on the release of taurine stimulated by light.

Sodium aspartate, at high concentrations, blocks the response to illumination of cells postsynaptic to photoreceptors [Furukawa and Hanawa, 1955; Dowling and Ripps, 1971]. Tetrodotoxin eliminates the response of transient potential generating cells, i.e., amacrine and some bipolar cells [Miller and Dacheux, 1976]. The effect of these two compounds on the light-stimulated release of taurine was examined. Also, the effects of antagonists of postsynaptic receptors of the major neurotransmitters in the retina were examined. Strychnine, picrotoxin, chlorpromazine, atropine, tubocurarine, the glutamic acid diethyl ester (GDEE), α -amino adipate (α -AA), and 2-amino-4-phosphonobutyrate (PBA) were used as tools to investigate whether cells releasing taurine upon illumination are receiving synaptic inputs from cells releasing GABA, glycine, dopamine, acetylcholine, or the excitatory amino acids aspartic and glutamic acid [Wyatt and Daw, 1976; Makman et al, 1980; Gerschenfeld and Piccolino, 1977; Yazulla and Schmidt, 1977; Johnston et al, 1974; Olney, 1971]. The effect of omission of calcium on the process of taurine release was reexamined [López-Colomé et al, 1976].

METHODS

Loading of retinas, superfusion, and light-stimulation were carried out essentially as previously described [Pasantes-Morales et al, 1981b]. Briefly, retinas of 2-3-week-old chicks, dark adapted, were excised under dim blue light and incubated in a Krebs-bicarbonate medium (NaCl, 118 mM; KCl, 4.7 mM; CaCl_2 , 2.5 mM; KH_2PO_4 , 1.6 mM; MgSO_4 , 1.1 mM; Na_2HCO_3 , 25 mM; glucose, 5.6 mM) pH 7.4, containing ^3H -taurine (2 $\mu\text{Ci/ml}$, 10 μM final concentration). After 10 min of incubation, retinas were washed and transferred to a superfusion chamber of 0.25-ml volume. Superfusion was carried out with warmed medium pumped at a rate of 1.5 ml/min by a Buchler multistaltic pump. The superfusate was collected every minute and a baseline release was reached after 6-8 min of superfusion. Light stimulation was applied by an electronic flash apparatus giving a white light pulse of 1-msec duration, with an energy of 12 J. The light source was placed at a distance of 20 cm from the perfusion chamber. Flashes were applied continuously during 120 sec and superfusion continued for another 20 min. At the end of the superfusion the retinas were solubilized and the radioactivity remaining in the tissue and that on the superfusate fractions was measured after the addition of Tritosol [Fricke, 1975]. The entire procedure was carried out under dim blue light. To test the effect of drugs, they were

added to the superfusion medium, and results were compared to those observed in retinas perfused with medium without additions in parallel experiments.

The identity of radioactive taurine released in the fractions was checked by chromatographic analysis of pooled, concentrated fractions. Paper chromatography in phenol:water (4:1) was used as previously described [Tapia and Sandoval, 1977]. By this procedure, 92% of the released radioactivity was localized in the taurine standard spot.

The efflux of radioactive taurine is expressed as the percentage release per unit time of the total amount of radioactivity incorporated by the retina.

For autoradiographic studies, retinas were incubated with ^3H -taurine (100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) for 45 min at 37°C in the dark. After incubation, retinas were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M cacodylate buffer, pH 7.2, at room temperature for 30 min and at 4°C overnight. Retinas were processed for microscopy by postfixation with 1% OsO_4 , dehydration in ethanol and propylene oxide, and embedding in Epon. Sections 1 μm thick were placed on slides and dipped in Kodak NTB-2 Nuclear Track emulsion (previously diluted with water (1:1)). Sections were exposed for 2-3 weeks, developed (Dektol developer), fixed at 4°C, and stained with Richardson stain.

RESULTS

Figure 1 shows the distribution of taurine accumulated by the chick retina. Labeling was found localized at the photoreceptors in both the inner and the outer segments, which appear to be heavily labeled. Label was also found in cells of the inner nuclear layer, processes of the inner plexiform layer, and occasional somas of the ganglion cell layer (Fig. 1).

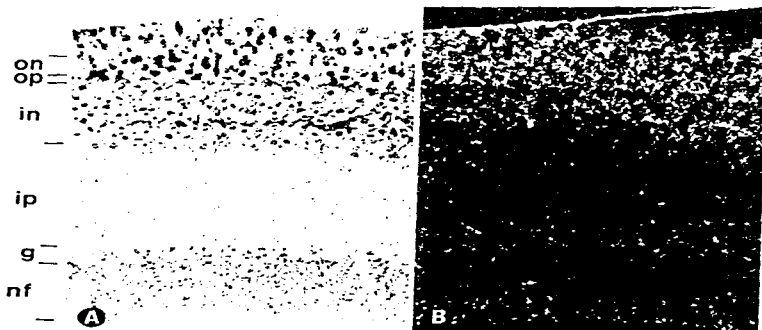


Fig. 1. Light microscopic autoradiography of ^3H -taurine uptake by chick retina ($\times 500$). A. Conventional optics. B. Darkfield optics. Retinal layers are designed as follows: on, outer nuclear layer; op, outer plexiform layer; in, inner nuclear layer; ip, inner plexiform layer; g, ganglion cell layer; nf, nerve fiber. Retinas were incubated for 45 min with ^3H -taurine, 100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$.

Retinas preloaded with ^3H -taurine and superfused with a Krebs-bicarbonate medium reach a constant fractional release after 6–8 min of superfusion. The efflux rate of the spontaneous efflux was about 0.2% per min. Illumination with flashes at this time increases this efflux by 80–100% [Pasantes-Morales et al. 1981b], (Fig. 2).

When superfusion was carried out with a calcium-free medium, supplemented with 100 μM EGTA, a marked increase in the resting efflux of taurine of more than four times over the resting release is observed, whereas the response to light was abolished (Fig. 2).

The effect of superfusion of chick retinas with 10 mM aspartate is shown in Figure 3. At this concentration, aspartate increased the resting efflux of ^3H -taurine by about 1.5 times. Upon illumination a further increase in the release of the amino acid was observed. The extent of this increase was similar to that observed in illuminated retinas perfused in the absence of aspartate (Fig. 3). Superfusion of chick retinas with a medium containing 1 μM tetrodotoxin induced a 40% increase in the

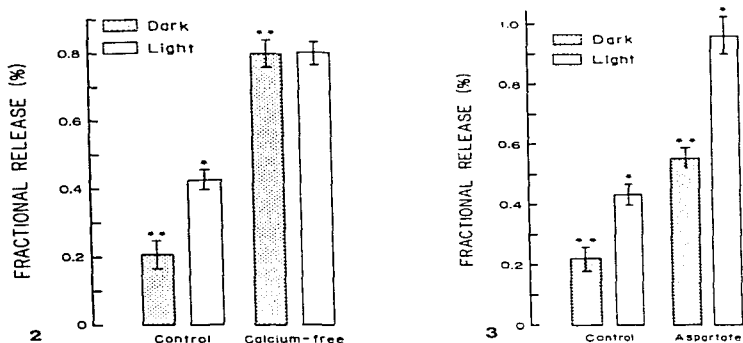


Fig. 2. The effect of omission of calcium on the light-stimulated release of ^3H -taurine from the chick retina. Retinas from dark-adapted chicks were loaded with ^3H -taurine and superfused as described in Methods. In the calcium-free medium, CaCl_2 was omitted and the Krebs-bicarbonate medium was supplemented with 100 μM EGTA. The shaded bars represent the percentage release of ^3H -taurine at the baseline prior to stimulation. The white bars represent the peak release of labeled taurine after light stimulation. Results are the means \pm SEM of eight separate experiments. *Taurine release after light stimulation was significantly different from that prior to stimulation at $P < .001$. **Taurine efflux in the dark in a calcium-free medium was significantly different from that in a calcium-containing medium at $P < .001$.

Fig. 3. The effect of 10 mM aspartate on the light-stimulated release of ^3H -taurine from the chick retina. The experimental procedure was as described in Methods and results are expressed as described in Figure 1. Results are the means \pm SEM of 14 separate experiments. *Light-stimulated release of taurine in the presence of 10 mM aspartate was significantly different from light-stimulated taurine release in the absence of aspartate at $P < .001$. **Taurine efflux in the dark in the presence of 10 mM aspartate was significantly different from that in the absence of aspartate at $P < .001$.

spontaneous efflux of ^3H -taurine and decreased by 25% the stimulated release (Table D).

The effect of antagonists of the synaptic receptors of compounds with recognized action as neurotransmitters on the release of ^3H -taurine is shown in Figure 4. Drugs were used at concentrations known to block postsynaptic neurotransmitter activity in a variety of preparations. Strychnine, picrotoxin, chlorpromazine, atropine, and tubocurarine all failed to modify the light-stimulated release of ^3H -taurine (Fig. 4). Strychnine and picrotoxin decreased the spontaneous release of taurine by 21% whereas tubocurarine and atropine increased it by 34%.

Blockade of glutamic and aspartic acid receptors by GDEE and α -AA significantly increased the light-stimulated release of taurine, producing no change in the

TABLE I. The Effect of Tetrodotoxin on the Light-Stimulated Release of ^3H -Taurine From the Chick Retina*

| Condition | Resting efflux | Stimulated efflux | Stimulation (%)** |
|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Control | 0.35 \pm 0.056* | 0.63 \pm 0.052 | 80 |
| Tetrodotoxin | 0.49 \pm 0.053* | 0.79 \pm 0.065 | 61 |

†Loading, superfusion, and stimulation of retinas were as described in Figure 2. Tetrodotoxin at a concentration of 1 μM was present during all the superfusion period. Results are expressed in percentage fractional release as described in Methods and in Figure 2. Results are the means \pm SEM of six separate experiments.

*Difference in the resting efflux in control-tetrodotoxin $P < .05$.

**Difference in percentage stimulation between the two groups $P < .05$.

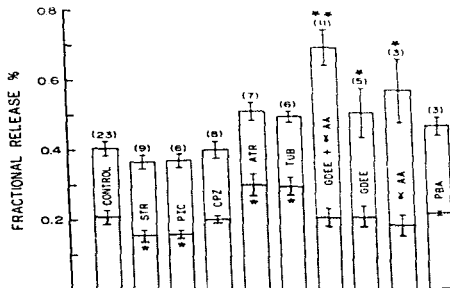


Fig. 4. Effects of antagonists of synaptic receptors on the light-stimulated release of ^3H -taurine from the chick retina. Retinas were loaded with ^3H -taurine and superfused with a Krebs-bicarbonate medium containing the additions indicated at each experiment. The concentrations of the drugs examined were as follows: strychnine (STR), 300 μM ; picrotoxin (PIC), 200 μM ; chlorpromazine (CPZ), 10 μM ; atropine (ATR) and tubocurarine (TUB), 100 μM ; glutamic acid diethyl ester (GDEE) and α -amino adipate (α -AA), 300 μM ; 2-aminophosphobutyric acid (PBA), 500 μM . The shaded part of the bar represents the resting efflux and the white part the stimulated efflux as described in Figure 1. Results are the means \pm SEM of the number of experiments indicated in parentheses. * $P < .05$. ** $P < .001$.

resting efflux (Fig. 4). PBA, a glutamate analogue which selectively blocks α -channels [Slaughter and Miller, 1981], modified neither the resting nor the light-stimulated release of ^3H -taurine. The stimulatory effect of GDEE and α -AA on ^3H -taurine release was unaffected by tetrodotoxin (results not shown).

DISCUSSION

An increased release of taurine from the retina in response to illumination has been described in chick, rabbit, rat, and cat retina [Schmidt, 1978; Pasantes-Morales et al., 1973; Neal, 1979]. The photoreceptor layer has been suggested as the site from which the release of taurine occurs since (1) the highest concentration of taurine is found in photoreceptors [Orr et al., 1976], (2) exogenous labeled taurine accumulates also preferentially in photoreceptors [Lake et al., 1978], and (3) degeneration of the inner retinal layers by treatment with kainic acid does not result in a decrease in the release of taurine induced by light [Pasantes-Morales et al., 1981b].

A direct approach to identify the cells releasing taurine by means of autoradiographic techniques is unreliable, since the amount of labeled taurine released upon stimulation represents only a minor fraction of the total amount incorporated by the retina and the differences in label in the retina before and after stimulation are certainly beyond the resolution of the technique.

In the present study we have taken advantage of the known effects of high concentrations of aspartate on retinal cell activity when attempting to identify the cellular origin of the labeled taurine released by light. Aspartate at high concentrations eliminates the response to light of cells postsynaptic to photoreceptors by inducing depolarization [Furukawa and Hanawa, 1955; Dowling and Ripps, 1971]. Therefore in the presence of aspartate, taurine release occurring from cells postsynaptic to photoreceptors was expected to be significantly decreased. In this study it was found that aspartate markedly increased the spontaneous efflux of taurine, confirming earlier observations on the stimulatory effect of depolarizing agents on taurine release [López-Colomé et al., 1976; Kurzinger and Hamprecht, 1981]. However, light stimulation was still able to increase taurine release over the already high resting efflux, with percentage increases similar to those observed in controls. These observations suggest that taurine release stimulated by light is probably occurring from cells which are unaffected by the aspartate blockade.

The possibility that taurine release stimulated by light results from synaptic activation of cells located at the inner retinal layers was examined by using tetrodotoxin. Some cells in the inner retinal layers with the position of amacrine cells are heavily labeled with ^3H -taurine and have been proposed as taurinergic amacrine cells [Voaden et al., 1977; Lin et al., 1983]. Amacrine cells, in contrast to photoreceptor cells, horizontal cells, and bipolar cells whose responses have never been associated to nerve impulses, respond to retinal stimulation with transient potentials on which nerve impulses are superimposed. The activity of amacrine cells is sensitive to tetrodotoxin. Our present results showing that tetrodotoxin induces only a 25% decrease in the release of taurine stimulated by light are consistent with the view that the bulk of taurine release is probably occurring from cells insensitive to the drug.

The above observations, all together, point to photoreceptors as constituting a main site of taurine release in response to light, although some release from amacrine cells cannot be totally excluded. Consistent with this view is the observation that the

light-stimulated release of ^3H -taurine was found unaffected by antagonists of the major neurotransmitters in the retina, i.e., GABA, glycine, dopamine, and acetylcholine. This result contrasts with that observed for other neurotransmitters such as acetylcholine, whose release stimulated by light is modulated by the activity of GABA receptors [Massey and Neal, 1979].

The release of taurine was modified only by the antagonists of the excitatory amino acids glutamic and aspartic acid, which markedly increased the efflux of taurine stimulated by light. Glutamic and aspartic acid are most likely the neurotransmitters tonically released from photoreceptors in the dark [Neal et al. 1979; Marc and Lam, 1981] and therefore, a blockade of their postsynaptic receptors would simulate the effect of light. However, GDEE and α -AA did not modify the resting efflux of taurine but induced a significant increase in the light-stimulated release. At present we cannot offer a plausible explanation for this result.

The release of taurine stimulated by light was found to be strictly calcium dependent, confirming an earlier observation [Pasantes-Morales et al. 1974]. Calcium omission induced a marked increase in the spontaneous efflux of taurine, similar in magnitude to that observed in the presence of aspartate, but whereas under this latter condition, light still induced a further increase of taurine efflux, this does not occur in a calcium-free medium. This effect of omission of calcium on increasing taurine release has also been reported by Korpi and Oja [1984] and by Holopainen et al [1985] in brain slices and cultured astrocytes. The following mechanisms have been suggested to explain the stimulatory effect of calcium-free media: (1) destabilization of membranes by removal of endogenous calcium caused by omission of exogenous calcium, (2) depolarization of the membranes due to direct action of the chelators, (3) increased sodium influx due to an inhibition of membrane Na^+K^+ -ATPase, which would increase sodium influx leading to taurine release. In a previous work [López-Colomé et al. 1976] we have shown that ruthenium red and verapamil failed to modify the light-stimulated release of taurine. These compounds inhibit calcium accumulation by nerve endings and interfere with the stimulus-secretion coupling [Rahamimoff and Alnaes, 1973; Eto et al. 1974]. The observation that the release of taurine elicited by light is unaffected by these drugs may also be taken as evidence in support of the notion that this release occurs from sites different from presynaptic terminals.

The present results are consistent with the suggestion that photoreceptors are the cells releasing taurine upon illumination. Although the physiological significance of this observation remains unclear, some mechanisms relating taurine to the physiological processes occurring during photoexcitation may be considered. These include an effect of taurine on calcium binding [Pasantes-Morales et al. 1979; Lombardini, 1983], a possible role as an antioxidant [Pasantes-Morales and Cruz, 1985], or an action as an osmotic effector.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grant 5R01 EY 02540-07 from NIH, by grant PCSABNA-030775 from CONACYT, and by a grant from Fondo Ricardo J. Zevada.

REFERENCES

- Dowling JE, Ripps H (1971): Aspartate isolation of receptor potentials in the skate retina. *Biol Bull* 141:384-385.
- Eto S, Wood JM, Hutchins M, Fleischer N (1974): Pituitary $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and release of ACTH, GH and TSH: Effect of verapamil. *Am J Physiol* 226:1315-1320.
- Fricke U (1975): Tritiosol: A new scintillation cocktail based on Triton X 100. *Anal Biochem Res* 7(3):317-328.
- Furukawa T, Hanawa I (1955): Effects of some common cations on electroretinogram of toad. *Jpn J Physiol* 51:289-300.
- Gerschenfeld HM, Piccolino M (1977): Muscarinic antagonists block cone to horizontal cell transmission in turtle retina. *Nature* 268:257-259.
- Hayes KC, Carey RE, Schmidt SY (1975): Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science* 188:949-951.
- Holopainen I, Kontro P, Oja SS (1985): Release of preloaded taurine and hypotaurine from astrocytes in primary culture: Stimulation by calcium-free media. *Neurochem Res* 10:123-131.
- Johnston GAR, Curtis DR, Davies J, McCulloch RM (1974): Spinal interneurones: excitation by conformationally restricted analogues of L-glutamic acid. *Nature* 248:804-805.
- Kennedy AJ, Voaden MJ (1976): Studies on the uptake and release of radioactive taurine by the frog retina. *J Neurochem* 27:131-137.
- Korpi ER, Oja SS (1984): Calcium chelators enhance the efflux of taurine from brain slices. *Neuropharmacology* 23:377-380.
- Kubicek R, Dolenek A (1958): Taurine et acides aminés dans la rétine des animaux. *J Chromatogr* 1:266.
- Kurzinger K, Hamprecht B (1981): Na^{+} -Dependent uptake and release of taurine by neuroblastoma \times glioma hybrid cells. *J Neurochem* 37(4):956-967.
- Lake N, Marshall J, Voaden MJ (1978): High affinity uptake sites for taurine in the retina. *Exp Eye Res* 27:713-718.
- Lin CT, Li HZ, Wu JY (1983): Immunocytochemical localization of L-glutamate decarboxylase, gamma-aminobutyric acid transaminase, cysteine sulfinate acid decarboxylase, aspartate aminotransferase and somatostatin in rat retina. *Brain Res* 270:273-283.
- Lombardini JB (1983): Effects of ATP in taurine on calcium uptake by membrane preparations of the rat retina. *J Neurochem* 40:402-407.
- López-Colomé AM, Erlij D, Pasantes-Morales H (1976): Different effects of calcium flux-blocking agents on light and potassium stimulated release of taurine from retina. *Brain Res* 113:527-534.
- Maknan MH, Dvorkin B, Harowitz SG, Thal LS (1980): Properties of dopamine and antagonist binding in mammalian retina. *Brain Res* 194:403-418.
- Mandel P, Pasantes-Morales H, Urban PF (1976): Taurine, a putative transmitter in retina. In Bonting SL (ed): *Transmitters in the Visual Process*. Oxford, New York: Pergamon Press Ltd, pp 89-105.
- Marc RE, Lam DMK (1981): Uptake of aspartic acid and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7185-7189.
- Massey SC, Neal MJ (1979): The light evoked release of acetylcholine from the rabbit retina *in vivo* and its inhibition by γ -aminobutyric acid. *J Neurochem* 32:1327-1329.
- Miller RF, Dacheux RF (1976): Synaptic organization and ionic bases of on and off channels in mudpuppy retina. *Brain Res* 104:157-169.
- Neal MJ, Collins GG, Massey SC (1979): Inhibition of aspartate release from the retina of anesthetized rabbits by stimulation with light flashes. *Neurosci Lett* 14:241-245.
- Olney JW, Ho OL, Rhee X (1971): Cytotoxic effects of acidic and sulphur-containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* 14:61-76.
- Orr HT, Cohen AL, Lowry H (1976): The distribution of taurine in the vertebrate retina. *J Neurochem* 26:609-611.
- Pasantes-Morales H, Kleithi J, Ledig M, Mandel P (1972): Free amino acids in chicken and rat retina. *Brain Res* 41:494-497.
- Pasantes-Morales H, Urban PF, Kleithi J, Mandel P (1973): Light stimulated release of ^{35}S -taurine from chicken retina. *Brain Res* 51:375-378.
- Pasantes-Morales H, Kleithi J, Urban PF, Mandel P (1974): The effect of electrical stimulation, light and amino acids on the efflux of ^{35}S -taurine from the retina of domestic fowl. *Exp Brain Res* 19:131-141.

- Pasantes-Morales H, Ademe RM, López-Colomé AM (1979): Taurine effects on calcium transport in retinal subcellular fractions. *Brain Res* 172:131-138.
- Pasantes-Morales H, Ademe RM, Quesada O (1981a): Protective effect of taurine on the light-induced disruption of isolated frog rod outer segments. *J Neurosci Res* 6:337-348.
- Pasantes-Morales H, Quesada O, Cárabez A (1981b): Light-stimulated release of taurine from retinas of kainic acid treated chicks. *J Neurochem* 36:1583-1586.
- Pasantes-Morales H, Quesada O, Cárabez A (1983): Effect of taurine transport antagonist, guanidinoethane sulfonate and β -alanine on the morphology of rat retina. *J Neurosci Res* 9:135-144.
- Pasantes-Morales H, Cruz C (1985): Taurine and hypotaurine inhibit light-induced lipid peroxidation and protect rod outer segment structure. *Brain Res* 330:154-157.
- Rahamimoff R, Alnaes E (1973): Inhibitory action of ruthenium red on neuromuscular transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3613-3616.
- Schmidt SY (1978): Taurine fluxes in isolated cat and rat retinas: Effect of illumination. *Exp Eye Res* 26:529-535.
- Slaughter MM, Miller RF (1981): 2-amino-4-phosphonobutyric acid: A new pharmacological tool for retina research. *Science* 211:182-185.
- Tapia R, Sandoval ME (1977): Possible participation of gamma-aminobutyric acid in the regulation of protein synthesis in brain, in vivo. *Brain Res* 69:255-263.
- Voaden MJ, Lake N, Marshall J, Morjaria B (1977): Studies on the distribution of taurine and other amino acids in the retina. *Exp Eye Res* 25:249-257.
- Wyatt HJ, Daw NW (1976): Specific effects of neurotransmitter antagonists on ganglion cells in rabbit retina. *Science* 191:204-205.
- Yazulla S, Schmidt J (1977): Two types of receptor for alpha bungarotoxin in the synaptic layers of the pigeon retina. *Brain Res* 138:45-57.

2.2. Interacción de neuronas aminoacídicas en la retina de los vertebrados.

2.2.1. Introducción y antecedentes.

Como se mencionó en la sección 1.4., los aminoácidos neuroactivos han sido considerados los candidatos que cuentan con una mayor cantidad de evidencias que apoyan una función como transmisores en los diferentes tipos neuronales de la retina.

Tanto el glutamato como el aspartato han sido considerados neurotransmisores excitadores en algunas áreas del SNC (Roberts, 1981). Los estudios electrofisiológicos y farmacológicos sugieren la presencia de al menos tres tipos de receptores sinápticos que median los efectos de los aminoácidos excitadores (Watkins et al., 1981). Todas estas clases de receptores interactúan con el glutamato y el aspartato, mostrando una sensibilidad farmacológica diferente. En términos de preferencia por agonistas, se han distinguido los preferentes al ac. gálico, al ac. quisquállico y al N-metil D-aspartato (NMDA). Los sitios del NMDA son antagonizados preferencialmente por el ac. 2-amino 5-fosfonovalérico y el ac. alfa-aminoadípico, mientras que el glutamato dietil ester (GDEE) es antagonista preferente de los receptores al ac. quisquállico. El compuesto gamma-L-glutamil glicina actúa como antagonista de los sitios de unión del kainato y NMDA.

En la retina (tabla II) se han detectado los mismos tipos de receptores sinápticos. Recientemente se ha postulado la presencia de otro tipo de receptor sensible al ac. 2-amino-4-fosfobutírico (APB). Este receptor, a diferencia de los otros tres, produce una respuesta hiperpolarizante al ser activado y

probablemente esté localizado sobre las células bipolares despolarizantes "encendidas".

Tabla II

Clases de receptores sinápticos para los aminoácidos excitadores

| RECEPTOR PREFERENTE A: | ANTAGONISTAS |
|-------------------------|---|
| Acido kainico | Gamma-D-glutamil glicina |
| Acido quisqualico | Glutamato dietil ester Gamma-D-glutamiltaurina |
| N-metil D-aspartato | 2-Amino-5-fosfonovalerato Alfa-aminoadipato 2-Amino-7-fosfoheptanoato |
| 2-amino-4-fosfobutirato | |

El empleo de técnicas bioquímicas y electrofisiológicas ha permitido establecer esquemas generales de localización de los aminoácidos excitadores como transmisores de la retina de los vertebrados. Recientemente López-Colomé y Semchano (1986) sugirieron, a partir de un modelo de degeneración neuronal por kainato, la presencia en la retina de pollo de células horizontales y amacrina GABAérgicas con receptores sinápticos para los aminoácidos excitadores. Asimismo, propusieron que las células bipolares "encendidas" podrían usar aspartato como transmisor y que las bipolares "apagadas" utilizarían al glutamato.

Así, a partir de la mayoría de los estudios llevados a cabo en retinas de diferentes especies se ha propuesto (Morgan, 1983) que el transmisor de los fotorreceptores (glutamato,

aspartato o algún compuesto endógeno relacionado con éstos) al ser liberado podría unirse a los receptores preferentes del ac. kainico y quisqualico localizados sobre las células horizontales y bipolares "apagadas" y con los receptores preferentes al kainato y APB en las células bipolares "encendidas". El transmisor de las células bipolares (aspartato o algún compuesto endógeno del tipo de los aminoácidos excitadores) interactuaría con receptores preferentes al NMDA en las células amacrinas y ganglionares.

Por otro lado, como ya se mencionó en secciones previas (secc. I.4.), el GABA puede ser el transmisor de una subpoblación de las células horizontales y amacrinas, mientras que la glicina podría ser el neurotransmisor de ciertas células amacrinas. Por otra parte, existen suficientes evidencias bioquímicas y electrofisiológicas que apoyan la posibilidad de que la dopamina funcione como transmisor en algunas células amacrinas e interplexiformes. Se desconoce, sin embargo, si todas o algunas de las subpoblaciones que manejan estos tres compuestos interactúan directamente con las distintas vías aminocidérgicas mencionadas anteriormente, aunque en el caso de la dopamina existen evidencias básicamente morfológicas que permiten pensar que las neuronas dopaminérgicas no reciben entradas sinápticas directas de neuronas aminocidérgicas excitadoras en peces y mamíferos. Es interesante conocer no solo si se dan dichas interacciones¹⁷ y de que manera estarían ordenados estos circuitos neuronales, sino también las diferencias existentes entre las diferentes especies de vertebrados. De esta forma se llegará a ampliar el conocimiento sobre las vías funcionales de la retina,

considerando no sólo el tipo de neurona de que se trate sino también la naturaleza bioquímica de éstas y las diferencias interespecíficas.

Como parte de los antecedentes de este trabajo se mostrarán los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo para conocer como se afectaba la liberación de GABA, glicina y taurina por activación de los diferentes tipos de receptores de los aminoácidos excitadores en la retina de pollo, en un intento por conocer la interacción entre las neuronas aminocidérgicas en este tejido (secc. II.2.2.2.). Este estudio constituyó parte del trabajo de tesis de Maestría y sirvió como antecedente para el trabajo de investigación de esta tesis doctoral.

En la sección II.2.2.3. se mostrarán los resultados obtenidos bajo el mismo procedimiento experimental en retinas de tres especies diferentes. En este estudio, además, se identificaron autorradiográficamente los sitios de liberación del GABA liberado por acción de los aminoácidos excitadores, proporcionando así una localización morfológica a los circuitos funcionales considerados.

Utilizando el mismo procedimiento experimental y con el propósito de integrar a la dopamina dentro del panorama general de los diferentes circuitos neuronales de la retina, se mostrarán los resultados referentes a los efectos de los aminoácidos excitadores sobre la liberación de dopamina-H3 en retina de pollo (secc. II.2.3.).

Effects of Excitatory Amino Acids, and of Their Agonists and Antagonists on the Release of Neurotransmitters From the Chick Retina

J. Morán and H. Pasantes-Morales

Departamento de Neurociencias, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Mexico

Effects of glutamic, aspartic, and cysteic acid, and of kainic acid and N-methyl aspartate on the release of labeled GABA, glycine, and taurine were examined in isolated, perfused chick retina. Glutamic acid (0.5–2 mM), increased the release of ^3H -GABA by more than four times and that of ^{14}C -glycine by about two times. The release of GABA decreased 50% and that of glycine 95% in the presence of the antagonist of glutamic acid receptors, glutamate diethyl ester (300 μM). N-methyl aspartate, used as an agonist of aspartic acid receptors, preferentially increased the release of GABA (seven times) over that of glycine (three times). The stimulatory effect of N-methyl aspartate was antagonized by D- α amino adipate and by Mg. Kainic acid (10 μM) induced the release of glycine but not that of GABA. Cysteic acid failed to modify the release of any of the amino acids examined. The efflux of labeled taurine was practically unaffected by all the compounds utilized. The release of GABA by the excitatory amino acids and agonists was Ca-independent but Na-dependent, whereas the release of glycine was markedly Ca-dependent. The evidence presented here suggests that experimental conditions activating receptors of excitatory amino acids differently affect the release of inhibitory amino acids.

Key words: retina, amino acids, neurotransmitters

INTRODUCTION

Neuroactive amino acids appear to play a major role as synaptic transmitters in the retina [Neal, 1976]. Pharmacological and physiological evidence has suggested that the acidic amino acids, glutamic and aspartic acids, are the neurotransmitters

Address reprint requests to Herminia Pasantes-Morales, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F. Mexico.

Received December 29, 1982; accepted June 1, 1983.

released tonically from photoreceptor terminals in the dark [Trifonov, 1968; Gershenfeld and Piccolino, 1979; Marc and Lam, 1981]. Bipolar cell terminals also release some excitatory neurotransmitters, probably acetylcholine and/or glutamic or aspartic acid. Photoreceptors, in addition to communicating centrally with bipolar cells, are also connected laterally with horizontal cells. Although little is known on the identity of the transmitter used by horizontal cells, GABA has emerged as a candidate for this role, at least in some species [Lam et al, 1980; Wu and Dowling, 1980].

In the inner plexiform layer there is a great variety of synaptic connections, particularly in the retinas of complex organization like the chick retina. Bipolar cells synapse on ganglion and amacrine cells, which in turn connect with ganglion cells, bipolar cells, and other amacrine cells. A large population of amacrine cells receiving excitatory inputs from the bipolar cells has been shown to be inhibitory interneurons releasing GABA, glycine, and probably taurine [Neal, 1976; Voaden, 1976; Mandel et al, 1976]. Thus, the retina possesses a complex network of mutually interacting excitatory and inhibitory neurons releasing amino acids. In the present study we have investigated the effect of glutamic, aspartic, and cysteic acids, as well as of some agonists and antagonists of their synaptic action, on the release of labeled GABA, glycine, and taurine from the chick retina, in an attempt to identify the functional relationship between neurons using amino acids as transmitters in this tissue.

The actions of excitatory amino acids on neurons are mediated by synaptic receptors, which have been identified mainly on the basis of differential sensitivity. Three classes of receptors have been described [Johnston, 1979; Cotman et al, 1981]. One class is the glutamate-preferring receptors, which are studied using L-glutamic acid as the binding ligand; they are preferentially antagonized by glutamate-diethyl ester (GDEE) and are relatively insensitive to α -amino adipic acid (α AA) and Mg. The second class of receptors is the aspartate-preferring receptors, which are currently labeled using N-methylaspartate (NMA) as ligand; these receptors are antagonized by α AA and Mg but remain unaffected by GDEE. The third class of receptors for excitatory amino acids corresponds to those activated by kainic acid, which are relatively insensitive to both α AA and GDEE. Kainic acid has been frequently considered as a selective ligand for a class of receptors accepting L-glutamic acid in an extended conformation or for receptors for an as yet unidentified endogenous substance, which might be one of the sulfonic amino acids. Using these compounds as pharmacological tools, we have obtained results that may contribute to the understanding of functional circuitry in the retina.

METHODS

The retinas of chicks 3-4 weeks old were excised and incubated in a Krebs-bicarbonate medium (NaCl, 118 mM; KCl, 4.7 mM; KH_2PO_4 , 1.2 mM; CaCl_2 , 2.5 mM; MgSO_4 , 1.17 mM; NaHCO_3 , 25 mM; and glucose 5.6 mM), pH 7.4. After preincubation for 10 min at 37°C, radiolabeled amino acids ^{14}C -glycine (1.5 $\mu\text{Ci/ml}$), ^3H -GABA (2.5 $\mu\text{Ci/ml}$), or ^3H -taurine (7.5 $\mu\text{Ci/ml}$) were added and the incubation was continued for 15 min. Retinal subcellular fractions P_1 and P_2 were obtained as described by López-Colomé et al [1978]. Chick retinas were homogenized in 0.32 M sucrose containing 10^{-4} M MgSO_4 , and the homogenate was centrifuged at 900g to obtain fraction P_1 containing photoreceptor terminals. The supernatant was centri-

fused at 9,000g, 20 min, to obtain fraction P₂, which contains small synaptosomes derived from the plexiform layer. Subcellular fractions were incubated as described above, and aliquots of the suspension were collected on Millipore filters. Whole retinas or filters containing subcellular fractions loaded with radioactive amino acids were transferred to glass superfusion chambers of 0.25 ml volume. Superfusion was carried out with the Krebs-bicarbonate medium, containing 10^{-4} M aminooxyacetic acid for the experiments on ³H-GABA release. Fractions of the superfusate were collected at 1-min intervals directly into scintillation vials. Baseline was attained after a washing period of 18 min. Then, the medium was replaced by a medium containing the different excitatory amino acids or drugs tested. Antagonists, when used, were present from the beginning of the superfusion period. At the end of the superfusion, the retinas were solubilized with NCS (tissue solubilizer, Amersham). The radioactivity of collected fractions and that remaining in the tissue was measured using Tritosol as scintillant.

RESULTS

Effects of Glutamic Acid

Figure 1 shows the effect of 2 mM glutamate on the release of ³H-GABA, ¹⁴C-glycine, and ³H-taurine from whole chick retina. The efflux of the three labeled amino acids was stimulated by this glutamate concentration: The release of GABA

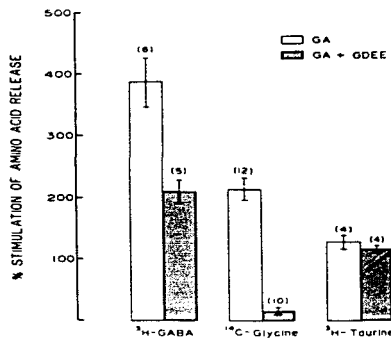


Fig. 1. Effects of glutamic acid glutamate diethyl ester (GDEE) on the release of ³H-GABA, ¹⁴C-glycine, and ³H-taurine from the isolated chick retina. Retinas preloaded with labeled amino acids were superfused at a rate of 0.6 ml/min with a Krebs-bicarbonate medium, at 37°C, for 18 min. Then the medium was replaced by one containing 2 mM glutamate and superfusion continued for 10 min. In experiments with GDEE, the drug (300 μM) was present through all superfusion. Each bar represents the peak value over baseline value. Results are the means ± SEM of the number of experiments indicated in parentheses.

increased by more than 4-fold, that of glycine by more than 2-fold, and the release of taurine almost doubled. Reducing the concentration of glutamate to 1 mM and 0.5 mM resulted in a proportional decrease in the amount of the released amino acids (results not shown). When perfusion was carried out with a medium containing GDEE (300 μ M), the glutamate-induced release of GABA was markedly reduced (about 50%) whereas that of glycine was practically abolished. Taurine release was unaffected by GDEE (Fig. 1). Perfusion in the presence of α AA did not affect the glutamate-stimulated release of any of the amino acids examined (results not shown).

The release of 3 H-GABA stimulated by glutamate was Ca-independent. Even higher values of stimulated release were observed when the retinas were perfused with a Ca-free medium, or with media containing EGTA (250 μ M) or 5 mM Mg. The release of 14 C-glycine was reduced in a Ca-free media but it was increased when the medium contained 5 mM Mg (Fig. 2). In contrast to the relative Ca-independence, the release of 3 H-GABA was markedly decreased when sodium was omitted from the perfusion medium and replaced by choline chloride, whereas the release of glycine was practically unaffected under these conditions (Table I).

The Effect of NMA

NMA was used as ligand for the aspartate-preferring receptors, and its effects as well as those of the antagonists α AA on the release of GABA and glycine are shown in Figure 3. Perfusion with NMA (0.5 mM) increased the release of 3 H-GABA by more than seven times over the resting efflux value, and this effect was markedly reduced when the perfusion medium contained α AA. The release of 14 C-glycine was increased about two times, but this efflux was not affected by α AA (Fig. 3). The release of taurine was practically unaffected in the presence of NMA. The efflux of 3 H-GABA was found to be reduced only when perfusion was carried out in

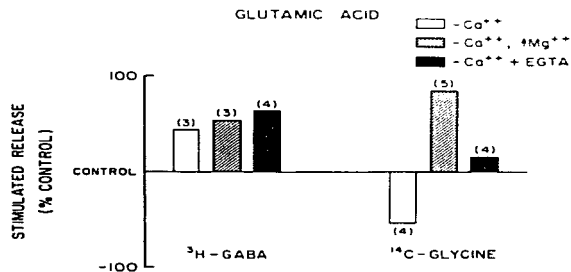


Fig. 2. Effects of Ca omission, high Mg concentrations, and EGTA on the glutamate-induced release of 3 H-GABA and 14 C-glycine. Assay conditions were as in Figure 1 except that superfusion was carried out with a Ca-free medium supplied with Mg (10 mM) or EGTA (250 μ M). Results are expressed as changes observed with respect to control stimulation values. Results are the means \pm SEM of the number of experiments indicated in parentheses.

the presence of 10 mM Mg. No significant decrease was observed in a Ca-free medium with or without EGTA. In contrast, the release of ^{14}C -glycine was markedly reduced in a Ca-free medium containing EGTA or 10 mM Mg (Fig. 4).

Effects of Kainic Acid and Cysteic Acid

KA was used as the ligand at the third class of excitatory amino acid receptor. The effect of kainic acid (10 μM) on the release of ^3H -GABA, ^{14}C -glycine, and ^3H -taurine is shown in Figure 5. Kainic acid produced only a slight increase in the efflux of labeled GABA and taurine, whereas, at the same concentration, the release of ^{14}C -glycine was highly stimulated. The effect of kainic acid on the release of glycine was unchanged in the presence of αAA or GDEE. The effect of cysteic acid on the release

TABLE I. Effect of Na^+ Omission on the Glutamate-Stimulated Release of ^3H -GABA and ^{14}C -glycine

| | Control | Without Na^+ (sucrose) | Without Na^+ (choline) |
|--------------------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| ^3H -GABA | 401.2 \pm 32.8 (5) | 159.3 \pm 37.0 (4) | 206.8 \pm 25.9 (5) |
| ^{14}C -glycine | 214.2 \pm 45.9 (5) | 168.3 \pm 10.3 (4) | 256.8 (2) |

Retinas loaded with labeled amino acids were superfused with normal Krebs-bicarbonate medium or with a medium in which NaCl was replaced by choline chloride (118 mM) or sucrose (250 mM). Results are the means \pm SEM of the number of experiments indicated in parentheses.

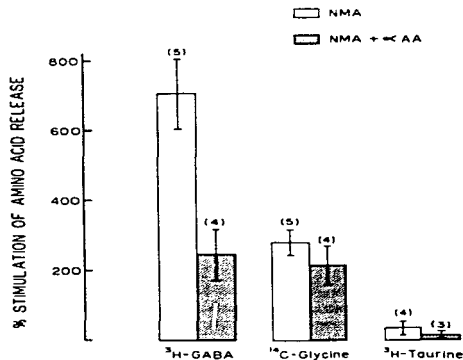


Fig. 3. Effects of N-methyl aspartate (NMA) and α -amino adipic acid (αAA) on the release of ^3H -GABA, ^{14}C -glycine, and ^3H -taurine from the chick retina. Experimental procedure was as described in Figure 1, except that amino acid release was induced by 500 μM NMA and the antagonist used was αAA , 300 μM . Results are the means \pm SEM of the number of experiments indicated in parentheses.

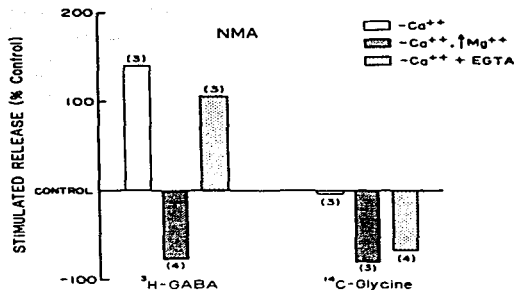


Fig. 4. Effects of Ca omission, high Mg concentrations, and EGTA on NMA-induced release of ³H-GABA and ¹⁴C-glycine from the chick retina. Details as for Figure 2. Results are the means \pm SEM of the number of experiments indicated in parentheses.

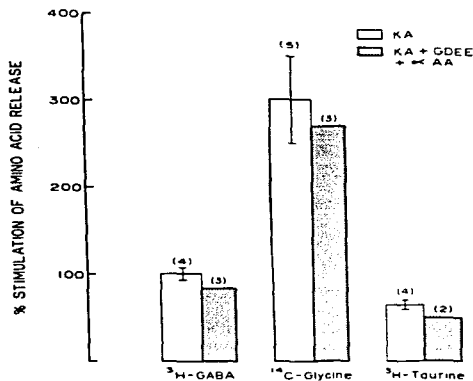


Fig. 5. Effects of kainic acid (KA), GDEE, and α AA on the release of ³H-GABA, ¹⁴C-glycine, and ³H-taurine from the chick retina. Procedure as described in Figure 1. The concentration of KA was 10 μ M, and that of the antagonists was 300 μ M. Results are the means \pm SEM of the number of experiments indicated in parentheses.

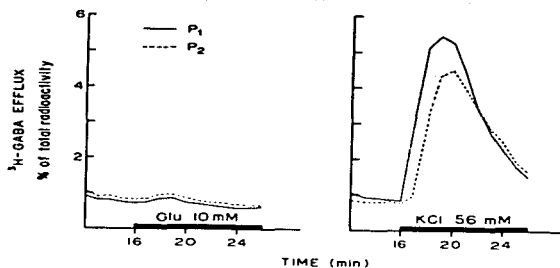


Fig. 6. Effects of glutamate and high potassium concentration on the release of $^3\text{H-GABA}$ from subcellular retinal fractions. P_1 and P_2 fractions were obtained as described in Methods. After loading with $^3\text{H-GABA}$, fractions were filtered through Millipore filters (0.45 μM pore size) and filters were superfused with Krebs-bicarbonate medium. At the time indicated by black bars, medium was replaced by one containing 10 mM glutamate or 56 mM KCl. Percentage of total radioactivity recovered every minute is plotted.

of the inhibitory amino acids was investigated. Tested at concentrations from 0.1 to 1 mM, this sulfonic acid failed to elicit the release of any of the inhibitory neurotransmitters (not shown).

Effects of Depolarizing Concentrations of KCl

With comparative purposes, the release of $^3\text{H-GABA}$ and $^{14}\text{C-glycine}$ elicited by 56 mM KCl as well as the ionic requirements of this process were studied. The release of GABA increased four times and that of glycine 3.5 times in the presence of the depolarizing stimulus. The potassium-stimulated release of both GABA and glycine was markedly reduced in a Ca-free or Mg-containing media (not shown).

Subcellular Fractions

Relatively high amounts of glutamic acid were required to observe the release of $^3\text{H-GABA}$ and $^{14}\text{C-glycine}$, and therefore the possibility that the effect of glutamate is due to unspecific depolarization induced through extrasynaptic receptors, and not by transsynaptic effects, cannot be excluded. To rule out this possibility, the effect of glutamic acid on the release of $^3\text{H-GABA}$ from isolated nerve endings was studied. Figure 6 shows that 10 mM glutamate failed to evoke any release of $^3\text{H-GABA}$ both from fraction P_1 containing nerve endings from photoreceptors, and from fraction P_2 containing synaptosomes from the plexiform layer. Kainic acid, at the concentration used in these experiments (10 μM), also failed to affect the release of GABA in the subcellular fractions (not shown).

To test the functional condition of our subcellular preparations, parallel experiments were carried out using high concentrations of KCl as depolarizing agent. Figure

6 shows that both fractions P₁ and P₂ responded very effectively to the depolarizing medium by increasing the release of ³H-GABA more than four times.

DISCUSSION

The present results show that excitatory neurotransmitter amino acids induce the release of inhibitory amino acids under conditions that suggest the involvement of postsynaptic receptors.

A large body of evidence suggests that glutamic acid may be the transmitter released by a population of photoreceptors [Trifonov, 1968; Gerschenfeld and Piccolino, 1979; Marc and Lam, 1981; Cervetto and Piccolino, 1974; Werblin, 1979]. Glutamic acid may also be the synaptic transmitter of bipolar cells [Neal, 1976]. Binding studies in bovine and chick retinal membranes have shown that postsynaptic receptors for glutamic acid are present in both the inner and the outer plexiform layers [López-Colomé, 1981; Mitchell and Redburn, 1982]. Recently Marc and Lam [1981] have shown in the goldfish retina that ³H-glutamic acid transported by a sodium-dependent mechanism, which is most probably labeling synaptic sites, is selectively accumulated by rods as well as by neurons from the inner retinal layers.

In the chick retina, glutamate induces the release of GABA and glycine. The ionic requirements of this release may be useful in the search of the cells from which this release is occurring. The glutamate-stimulated release of GABA is sodium-dependent but calcium-independent. This suggests two main possibilities for the site of GABA release—namely the horizontal cells and the glial cells. Studies of Yazulla and Kleinschmidt [1981] and Schwartz [1982] in the goldfish and the toad retina have shown that the release of GABA from the horizontal cells, stimulated by glutamate, is sodium-dependent but calcium-independent. It is suggested that transmitter release from these cells, which are devoid of synaptic vesicles, occurs through a sodium-dependent, carrier-mediated transport, apparently not involving a stimulus-secretion coupling triggered by calcium. In contrast, in the rat, the release of GABA induced by glutamate is a calcium-dependent process [Kamada et al. 1981]. This observation, together with the fact that GABA is not accumulated by horizontal cells in this species, suggests that GABA release occurs from cells other than horizontal cells, probably cells of the inner retina. Our results in the chick retina agree with those obtained in toad and goldfish retina, suggesting that horizontal cells may be a possible site of GABA release in this species. Other cells releasing GABA by a calcium-independent process are glial cells. However, a comparative study of Marshall and Voaden [1974] showed that in the chick retina ³H-GABA is not accumulated by Muller cells but only by amacrine, horizontal, and ganglion cells.

A typical feature of the glutamate-induced release of amino acids was the influence of Mg. In this study, Mg was used with the aim of decreasing the amount of calcium available for the process of neurotransmitter release. Surprisingly, this ion produced an increase rather than a decrease on neurotransmitter release. This effect may be due to the reported activatory action of Mg on the interaction of glutamate with its postsynaptic receptors [Baudry and Lynch, 1979]. This result, together with the observed inhibitory effect of GDEE, a known antagonist of the glutamate-induced synaptic actions [Roberts, 1974; Spencer, 1976; Davies and Watkins, 1979; López-

Colomé, 1981], supports the notion that the releasing effect of glutamate occurs through the activation of specific postsynaptic receptors. The observations on isolated nerve endings showing a failure of glutamate in stimulating GABA release are also in line with this notion. This point should be emphasized since glutamic acid exerts an extensive excitatory action in the CNS to such an extent that it is difficult to find neurons insensitive to its effects. These responses have been proposed to be mediated by the activation of extrasynaptic receptors leading to unspecific depolarization [Cull-Candy and Usherwood, 1973].

Although there is evidence suggesting that aspartic acid is an excitatory neurotransmitter in the CNS [Johnston et al. 1974], very little work to date has been directed toward the study of aspartate as neurotransmitter in the retina. Recent work of Ikeda and Sheardown [1981] has shown that L-aspartate enhances the visually driven excitation of a specific population of ganglion cells and that the excitatory responses of visual stimulation are specifically reduced by 2-aminophosphonovalerate, a powerful antagonist of NMA. However, Shiells et al [1981] have shown that α AA and aminophosphonovalerate do not affect membrane potential or responses to light in rod horizontal cells, although these cells are markedly affected by kainic acid. A study of Mitchell and Redburn [1982] on the binding of ^3H -aspartate to membranes of bovine retina has shown the presence of receptor sites with high-affinity constants. In the chick retina, binding sites for ^3H -aspartic acid are found in membranes from both the inner and outer plexiform layers [López-Colomé, 1981]. Accumulation of ^3H -aspartate by the goldfish retina is observed preferentially at a specific population of photoreceptors, as well as in glial cells, but not by horizontal, bipolar, amacrine, or ganglion cells [Marc and Lam, 1981]. The results of the present work, together with the above mentioned observations, suggest that stimulation of aspartic acid receptors is eliciting the release of GABA, either from cells connecting with photoreceptor or from bipolar cells. However, the marked differences observed in the distribution of retinal transmitters or uptake sites of labeled amino acids between species suggest caution when results obtained from different species are compared.

The release of GABA and glycine elicited by NMA was markedly reduced when Mg is added to the incubation medium. This effect is not due to a competition of Mg for calcium, since calcium-free media containing EGTA did not reduce the release of GABA. Rather this could be a specific effect of magnesium probably antagonizing the action of NMA at the receptor level, as it has been suggested by Davies and Watkins [1977] and Evans and Watkins [1978]. An opposite effect is observed when glutamic acid is used as ligand, as was mentioned above.

Kainic acid, a rigid structural analogue of glutamate, interacts with receptors that give rise to excitation in several brain areas. KA has been proposed as a selective agonist for L-glutamic acid-preferring receptors [Johnston, 1979; Evans and Watkins, 1978; Cotman et al. 1981]; however, recent electrophysiological [Hall et al. 1978] and biochemical [Foster et al. 1981; López-Colomé, 1981; Mitchell and Redburn, 1982] evidence suggests that KA is acting at a receptor population different from that for glutamic acid, and the results of the present work, showing differences between the amino acids released by KA and glutamic acid, also support this notion. It has been suggested that cysteic acid might be the natural transmitter of the receptors activated by KA. This hypothesis is not supported by the present results, since cysteic

acid failed to stimulate the release of any of the inhibitory amino acids studied, which were released by KA.

The differences observed between the responses elicited by each of the excitatory amino acids or ligands used in this study are consistent with the existence of different receptors for aspartic acid, glutamic acid, and KA in the chick retina. The results of the present work suggest that neurons releasing different excitatory amino acids establish selective functional connections with GABA-ergic and glycinergic cells. Further studies with histochemical techniques are necessary to identify the interconnected neurons precisely.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants 5R01 EY 02540-04 from NIH, and ICAINAL 800792 from CONACYT.

REFERENCES

- Baudry, Lynch G (1979): Regulation of glutamate receptors by cations. *Nature* 282:748-750.
- Carveto L, Piccolino M (1974): Synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells in the turtle retina. *Science* 183:417-419.
- Cotman CW, Foster A, Lanthorn T (1981): An overview of glutamate as a neurotransmitter. In Di Chiara G, Ges GL (eds): "Glutamate as a Neurotransmitter." New York: Raven Press, pp 1-27.
- Cull-Candy SG, Usherwood PSR (1973): Two populations of L-glutamate receptors on locust muscle fibres. *Nature* 246:62-64.
- Davies J, Watkins JC (1977): Effects of magnesium ions on the responses of spinal neurones to excitatory amino acids and acetylcholine. *Brain Res* 130:364-368.
- Evans RH, Watkins JC (1978): Dual site for antagonism of excitatory amino acids actions on central neurones. *J Physiol (Lond)* 277:571P.
- Foster AC, Mena EE, Monaghan G, Cotman CW (1981): Synaptic localization of kainic acid binding sites. *Nature* 289:73-75.
- Gerschenfeld HM, Piccolino M (1979): Pharmacology of the connections of cones and L-horizontal cells in the vertebrate retina. In Schmitt FG, Worden FG (eds): "The Neurosciences. Fourth Study Program." Cambridge, Massachusetts: MIT Press, pp 213-226.
- Hall JG, Hicks TP, McLennan H (1978): Kainic acid and the glutamate receptor. *Neurosci Lett* 8:171-175.
- Ikeida H, Sheardown MJ (1981): Aspartate may be an excitatory transmitter mediating visual excitation of "sustained" cells in the cat retina-iontophoretic studies in vivo. *J Physiol* 319:77P.
- Johnston GAR (1979): Central nervous system receptors for glutamic acid. In Filer LJ, Garattini S, Kare MP, Reynolds WA, Wortman RJ (eds): "Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology." New York: Raven Press, pp 177-185.
- Johnston GAR, Curtin DR, Davies J, McCulloch RM (1974): Spinal interneurons excitation by conformationally restricted analogues of L-glutamic acid. *Nature* 248:804-805.
- Kamada Y, Mizuno A, Matsuda M (1981): Effect of L-glutamic acid on ¹⁴C-GABA release from isolated rat retina. *Brain Res* 228:251-255.
- Lam DKM, Su Y-YT, Chin CA, Brandon J, Wu Y, Mare RE, Lasater EM (1980): GABAergic horizontal cells in the teleost retina. *Brain Res Bull* 5:137-140.
- López-Colomé AM (1981): High-affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. *Neurochem Res* 6:1019-1033.
- López-Colomé AM, Saleeda R, Pasantes-Morales H (1978): Potassium stimulated release of GABA, glycine and taurine from the chick retina. *Neurochem Res* 3:431-441.
- Mandel P, Pasantes-Morales H, Urban PF (1976): Taurine, a putative transmitter in retina. In Bonting SL (ed): "Transmitters in the Visual Process." Oxford, New York: Pergamon Press, pp 89-104.
- Mare RE, Lam DKM (1981): Uptake of aspartic acid and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7185-7189.

- Marshall J, Voaden MJ (1974): An autoradiographic study of the cells accumulating ^3H -aminobutyric acid in the isolated retina of pigeon and chicken. *Invest Ophthalmol* 13:602-607.
- Mitchell CK, Redburn DA (1982): 2-amino-4-phosphonobutyric acid and N-methyl-D-aspartate differentiate between ^3H -glutamate and ^3H -aspartate binding sites in bovine retina. *Neurosci Lett* 28:241-246.
- Neal MJ (1976): Amino acid transmitter substances in the vertebrate retina. *Gen Pharmacol* 7:321-332.
- Roberts PJ (1974): Glutamate receptors in the rat central nervous system. *Nature* 252:399-401.
- Schwartz EA (1982): Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina. *J Physiol* 323:211-227.
- Shiells RA, Falk G, Naghshech S (1981): Action of glutamate and aspartate analogues on rod horizontal and bipolar cells. *Nature* 294:592-594.
- Spencer HJ (1976): Antagonism of cortical excitation of striatal neurones by glutamic acid diethyl ester: Evidence for glutamic acid as an excitatory transmitter in rat striatum. *Brain Res* 102:91-102.
- Trifonov YA (1968): Study of synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells by means of electrical stimulation of retina. *Biofizika* 13:809-817.
- Voaden MJ (1976): The localization and metabolism of neuroactive amino acid in the retina. In Fonnum (ed): "Amino Acids as Transmitters." New York: Plenum Press, pp 257-274.
- Werblin FS (1979): Integrative pathways in local circuits between slow-potential cells in the retina. In Schmitz FO, Worden FG (eds): "The Neurosciences: Fourth Study program." Cambridge, Massachusetts: MIT Press, pp 193-211.
- Wu SM, Dowling JE (1980): Effects of GABA and glycine on the distal cells of the cyprinid retina. *Brain Res* 199:401-414.
- Yazulla S, Kleinschmidt J (1981): Carrier-mediated release of GABA from retinal horizontal cells. *Soc. Neurosci Abstr* 7:110.

Glutamate Receptor Agonists Release [³H]GABA Preferentially From Horizontal Cells

JULIO MORAN¹, IHERMINIA PASANTES-MORALES² and DIANNA A. REDBURN¹

¹*Department of Neurobiology and Anatomy, University of Texas Medical School at Houston, Houston, TX 77025 (U.S.A.)*
and ²*Centro de Investigaciones en Fisiologia Celula, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico (Mexico)*

(Accepted 6 May 1986)

Key words: Glutamate — Aspartate — Kainic acid — γ -Aminobutyric acid (GABA) — Retina

A total of 5–6 different cell types in vertebrate retinas accumulate [³H]-aminobutyric acid (GABA). In frog retina, specific populations of cells in the horizontal, amacrine and ganglion cell layers are labeled autoradiographically after a 15-min in vitro incubation with [³H]GABA. Cells which may be bipolar or interplexiform cells are also labeled. Similar autoradiographic patterns are observed in chick retina except for the absence of labeled bipolar or interplexiform cells. In rat retinas, [³H]GABA uptake is limited primarily to Muller and amacrine cells. Depolarizing glutamate receptor agonists (glutamate, aspartate and kainic acid) applied in an in vitro perfusion system, stimulated massive release of [³H]GABA from frog and chick retina but not from rat retina. Under these conditions, autoradiographic labeling of horizontal cells was virtually depleted, while labeling of other cell types remained robust. In contrast, potassium caused release of the label from all 3 types of retina, and loss of autoradiographic labeling occurred uniformly in all cell types. We conclude that [³H]GABA-accumulating horizontal cells possess depolarizing glutamate receptors and that activation of these receptors leads to a release of GABA stores. On the other hand, Muller cells and the various subclasses of [³H]GABA-accumulating amacrine, bipolar and/or interplexiform cells, do not release GABA in response to glutamate receptor stimulation and thus appear to be relatively insensitive to excitatory amino acids.

INTRODUCTION

There is a large body of evidence which suggests that amino acids play a major role in chemical transmission in the retina¹. Glutamate and/or aspartate (Glu/Asp) are principal candidates for the neurotransmitter(s) released from photoreceptor cells and from some classes of bipolar cells^{2,23,25,26,31}. These cells represent first and second order neurons respectively within the visual pathway of the retina. Various second and third order retinal neurons show different responses to Glu/Asp input, as a result of different types of Glu/Asp receptors have been postulated, based on their pharmacological sensitivity and electrophysiological responses^{2,4,14,23}. All of these receptors are sensitive to glutamate and aspartate; nevertheless, they can be distinguished on the basis of their relative affinities for 4 Glu/Asp analogues namely N-methyl-D-aspartate (NMDA), quisqualate (QA), kainate (KA), or 2-amino-4-phos-

phonobutyrate (APB). The APB type of Glu/Asp receptor displays a unique characteristic in that it causes hyperpolarization and it is probably limited in its retinal distribution to 'ON' depolarizing bipolar cells²⁴. The other three types of Glu/Asp receptors all lead to depolarization and their precise localization in retina is not as well established as the APB receptor^{1,23,25}.

Gamma aminobutyric acid (GABA) is probably an inhibitory neurotransmitter utilized by some amacrine cells in retina^{1,12}. In addition, horizontal cells and perhaps bipolar cells or interplexiform cells in retinas from nonmammalian vertebrates are probably GABAergic^{28–30,32}. These GABAergic cells represent secondary and tertiary cells in the retina. The relative position of the Glu/Asp releasing cells with respect to the GABAergic cells within the visual pathway, suggests that the release of GABA might be stimulated directly or indirectly by activation of depolarizing Glu/Asp receptors.

Correspondence: D.A. Redburn, Department of Neurobiology and Anatomy, University of Texas Medical School at Houston, P.O. Box 20708, Houston, TX 77025, U.S.A.

In a previous study¹⁰, we provided some evidence in support of this hypothesis. Depolarizing Glu/Asp receptor agonists stimulated massive release of [³H]GABA from chick. The present work was carried out in order to determine whether all GABAergic cells respond in an identical manner to glutamate, aspartate, and kainate stimulation or alternatively, if certain subpopulations are preferentially stimulated by these amino acids. Using both biochemical and autoradiographic analyses we determined the effects of aspartate, glutamate and kainate on [³H]GABA release from isolated retinas of 3 different species. We were able to quantify the stimulated release of [³H]GABA and distinguish its cellular source from among 5 different [³H]GABA-accumulating cells. Our results suggest that the massive release of [³H]GABA stimulated by Glu/Asp analogues, originates from horizontal cells, and furthermore that Muller cells and various subclasses of [³H]GABA accumulating amacrine, bipolar, and/or interplexiform cells are relatively insensitive to stimulation by these excitatory amino acids.

MATERIALS AND METHODS

Sprague-Dawley rats (150–200 g), white Leghorn chicks (2–4 months old), and frogs (*Rana pipiens*) were used for these experiments. Light-adapted animals were killed by decapitation and retinas were removed under room light. Tissue was incubated in Krebs-bicarbonate medium (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.17, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, and glucose 11.1, in a shaking bath at 37 °C and bubbled with O₂/CO₂ (95%/5%) to maintain pH at 7.4. After a period of 5 min, [³H]GABA (50 μCi/ml; 0.6 μM, final concentration) was added and the incubation continued for 15 min. Retinas were then transferred to glass superfusion chambers of 0.25 ml volume. Superfusion was carried out with bubbled Krebs-bicarbonate medium, at a flow rate of 0.6 ml/min. Fractions of the superfusate were collected at 1-min intervals directly into scintillation vials. Baseline was attained after a period of 17 min, after which the standard medium was replaced by one containing glutamate, aspartate, kainate, or depolarizing concentrations of KCl. At the end of the superfusion, one third of each retina was homogenized in 0.32 M sucrose and an aliquot solubilized with tissue

solubilizer (NCS, Amersham). The radioactivity of collected fractions and that remaining in the solubilized tissue were measured. The remaining retinas were fixed and processed for autoradiography. Both incubation and superfusion media contained aminoxyacetic acid (10⁻⁴ M) to inhibit [³H]GABA metabolism. Thin-layer chromatography verified that 88.4 ± 0.66% (n = 4) of the label remained as authentic [³H]GABA under these conditions.

After incubation with [³H]GABA or superfusion with depolarizing media, retinas were immediately fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M cacodylate buffer, pH 7.2 at room-temperature for half an hour and at 4 °C overnight. Retinas were processed for microscopy, by postfixation with 1% OsO₄, 1 h dehydration in ethanol and propylene oxide, and embedding in Epon. Sections of 1-μm thick were placed on slides and dipped in Kodak NTB-2 nuclear track emulsion previously diluted with water (1:1). Sections were exposed for 2–6 weeks, developed (Dektol developer), fixed at 4 °C, and stained with Richardson's stain.

RESULTS

Frog retina

Autoradiographs of control frog retina after a 15-min incubation period in [³H]GABA are shown in Fig. 1a–c. Labelling appears highly concentrated over some cell bodies located in the outermost part of the inner nuclear layer (INL), corresponding to the position of horizontal cells. Some nuclei in the middle of the INL are also heavily labelled, and some of them show processes which project to both plexiform layers (Fig. 1b–d), suggesting that these cells could be bipolar or interplexiform cells. Some cells in the amacrine cell layer are weakly labelled (Fig. 1e). In addition, both inner and outer plexiform layers (IPL, OPL) appear to have accumulated [³H]GABA. In more central areas of the retina, where the nerve fiber layer (NFL) is prominent, a high density of grains appears to be associated with ganglion cell axons (Fig. 1a, c, e). In more peripheral areas, with a thinner NFL, labelling is much less pronounced (Fig. 1d). Note that there is no [³H]GABA-uptake into Muller cells. When retinas were incubated without aminoxyacetic acid (AAOA), the labelling pattern of [³H]GABA was similar to those treated in the pres-

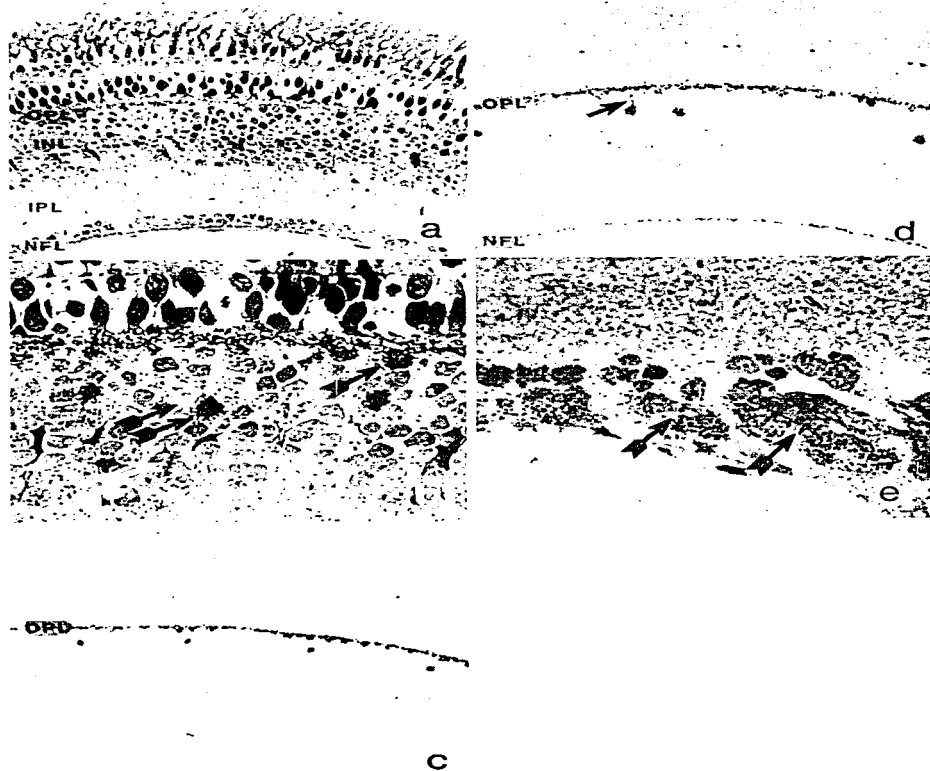


Fig. 1. Autoradiographic localization of [^3H]GABA in frog retina. a: stained autoradiogram shows normal, laminar arrangement of retinal neurons is relatively unaffected by a 15-min *in vitro* incubation period. Labeling is present in the outer plexiform layer (OPL), inner nuclear layer (INL), inner plexiform layer (IPL) and nerve fiber layer (NFL). $\times 100$. b: at higher magnification, labeling of horizontal cell bodies (single arrow) and processes in the OPL are readily appreciated. Labeling is also observed in a specific population of cell bodies in the middle of the INL (double arrows). The white arrow denotes a labeled process projecting to the IPL in which light labeling is also seen. $\times 550$. c, d: unstained autoradiographs demonstrate the relatively uniform distribution of labeled cell bodies in the INL from mid-peripheral retina (c, $\times 100$) and central retina (d, $\times 220$). In (d), note grains in the NFL, and labeled process projecting to the OPL (arrow). e: grains in the NFL are specifically localized in ganglion cell axons bundles (arrows). $\times 550$.

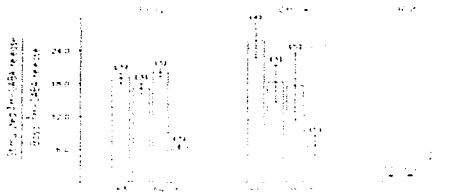


Fig. 2. Stimulation of [^3H]GABA release from frog, chick and rat retinas. Isolated retinas were pre-incubated in [^3H]GABA and perfused in buffer containing the stimulating agent. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of the radioactivity released in the presence of the stimulant divided by the radioactivity released in standard buffer just prior to the stimulation. The numbers of experiments are listed in parentheses.

ence of that drug (not shown).

Frog retinas were preloaded with [^3H]GABA for 15 min and then superfused with buffer until a stable baseline of efflux was established. Addition of glutamate, aspartate or kainic acid to the superfusion buffer caused a large increase in release rates (Table 1; Fig. 2). Kainic acid was much more potent than either glutamate and aspartate. Glutamate was only slightly more effective than aspartate in evoking [^3H]GABA release.

Autoradiographs of these retinas show that glutamic, aspartic and kainic acid caused a selective release of [^3H]GABA from horizontal cell bodies and

TABLE 1

Dose response of kainic, glutamic and aspartic acid-stimulated release of [^3H]GABA from frog retina

Conditions are the same as described in Fig. 2. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. (*n*) of the radioactivity released in the presence of the stimulant divided by that released in standard buffer just prior to the stimulation.

| | Kainic acid | Glutamic acid | Aspartic acid |
|-------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| 2 μM | 3.39 \pm 0.7 (4) | | |
| 20 μM | 9.97 \pm 1.5 (5) | | |
| 200 μM | 16.0 \pm 1.9 (4) | | |
| 500 μM | | 2.29 \pm 0.5 (3) | 3.79 (1) |
| 1 mM | 20.82 \pm 3.5 (4) | | |
| 2 mM | | 10.05 \pm 2.7 (3) | 8.56 (1) |
| 5 mM | | 8.04 \pm 0.9 (3) | 8.6 (1) |
| 10 mM | | 17.25 \pm 0.8 (4) | 20.3 (3) |

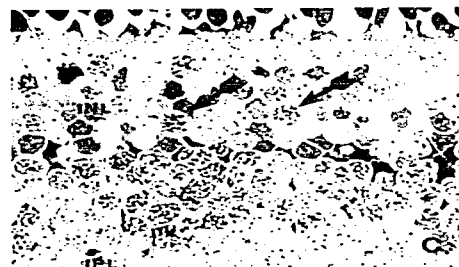
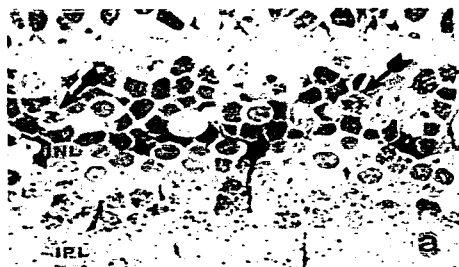


Fig. 3. Autoradiographs of [^3H]GABA in frog retina after chemical stimulation. Kainic acid, glutamate and aspartate caused loss of label from horizontal cell bodies and processes in the IPL. See Fig. 1 for comparison. Labeled cell bodies in the INL appear unaffected (arrows). a, 10 mM glutamate \times 550; b, 10 mM aspartate, unstained, \times 220; c, 200 μM kainic acid \times 550. Cellular damage is seen under all 3 stimulation conditions; however, chromotolysis and swelling are much more pronounced in kainic acid-treated tissue.

the OPL, but not from the bipolar or interplexiform cell bodies (Fig. 3a–c). Due to the relatively weak labelling of amacrine cells in control tissues it is difficult to determine with certainty whether or not amacrine cell labelling in this retina is changed by kainic acid treatment. In contrast, labelling of bipolar or interplexiform cell bodies is clearly unchanged by kainic acid treatment (Fig. 3c). In kainic acid-treated retinas, profiles in the OPL are swollen although many cell bodies in the horizontal cell layer are relatively unaffected (Fig. 3c). The heavy labelling in the OPL and horizontal cell layer, seen in control retinas (Fig. 1a–d), is virtually absent after kainic acid treatment (see Fig. 3c). There is substantial kainic acid-induced damage in the amacrine cell layer and vacuolization in the IPL.

In glutamate-treated retinas (Fig. 3a) the morphological damage is much less pronounced, although the general pattern of cell damage is similar to that seen with kainic acid. Vacuolization is observed in both the OPL and the IPL. Cells of amacrine cell layer show slightly more chromatolysis than those in the horizontal cell layer. As seen after kainic acid treatment, superfusion with glutamate also results in a complete loss of labelling in the horizontal cell layer and the OPL. Slight accumulation of label is observed in the amacrine cell layer, similar to controls. [3 H]GABA accumulation by bipolar cells remains robust after glutamate treatment.

Effects of aspartate (Fig. 3b) on both labelling and morphology of the retina were indistinguishable from those observed after glutamate-treatment.

Chick retina

In chick retina exposed to [3 H]GABA for 15 min, the label is concentrated by cells in the horizontal, amacrine, and ganglion cell layers (see Fig. 4). Among these, the horizontal cell layer is the most densely labelled. Labelling in the OPL forms a characteristic double layer, directly adjacent to labelled horizontal cell bodies. Grains are also present over the IPL, which frequently shows labelled sublayers. This sublaminar arrangement is most readily observed in unstained sections which have been overexposed as is shown in Fig. 4c. The sublayer immediately adjacent to the ganglion cell layer is the most prominently labelled. The high grain density over the NFL suggests that some of the labelled cell bodies in the

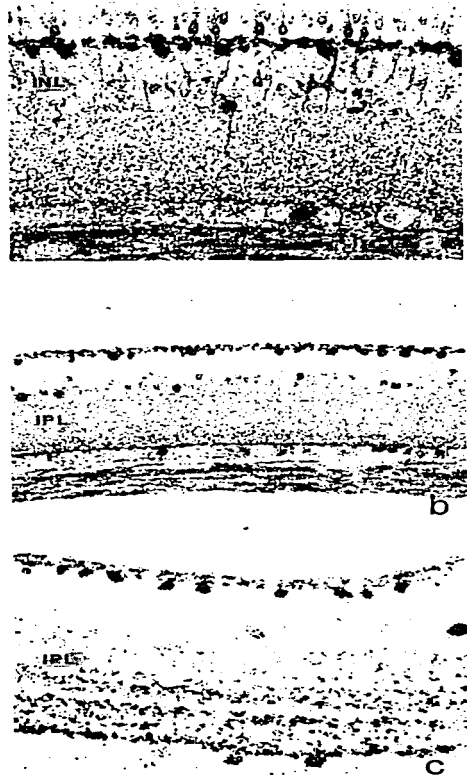


Fig. 4. Autoradiographic localization of [3 H]GABA in chick retina. a: stained autoradiogram shows dense accumulation in horizontal cell bodies and processes in the OPL. Cells in the IPL are less densely labeled. Other labeled elements include cell bodies in the ganglion cell layer and ganglion cell axons in the NFL. $\times 340$. b: unstained autoradiogram reveals the overall pattern of [3 H]GABA accumulation in the chick retina. Under these conditions, labelling in the IPL can be readily appreciated. $\times 220$. c: unstained autoradiogram, obtained with long exposure times, accentuates the lamination of labeling in the IPL. $\times 340$.

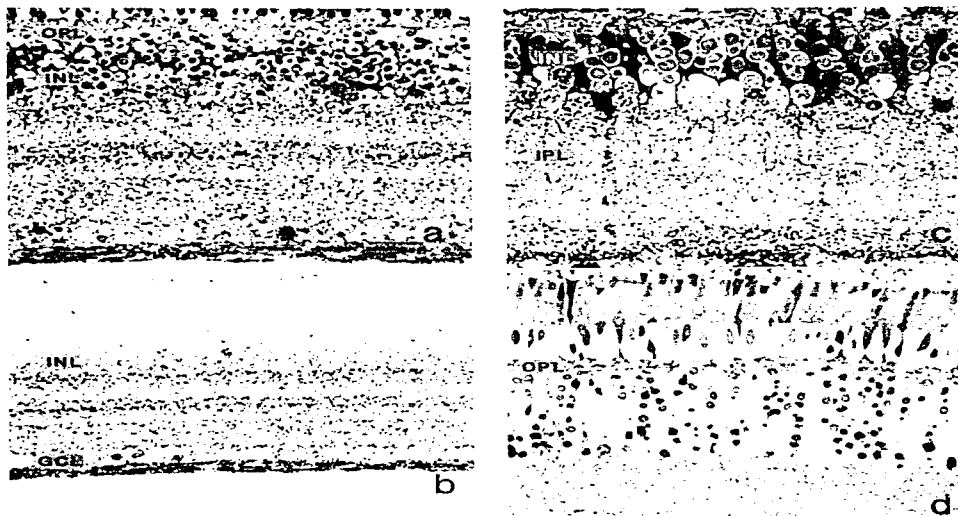


Fig. 5. Autoradiograms of [^3H]GABA in chick retina after chemical stimulation. Kainic acid, glutamate and aspartate caused loss of label from horizontal cell bodies and processes in the IPL. See Fig. 4 for comparison. (a) stained autoradiogram of chick retina exposed to 200 μM kainic acid shows swelling of most cell bodies in the INL and vacuolization in the OPL ($\times 350$). (b) in this unstained autoradiogram of chick retina exposed 200 μM kainic acid, labeling in the outer retina is absent. However, labeling of cell bodies in the GCL and to some extent in the INL are still present. Labeling in the sublaminae of the IPL is also apparent ($\times 170$). (c) stained section of chick retina exposed to 10 mM glutamate shows less swelling than that observed with kainic acid treatment, however, autoradiographic patterns are similar. Labeling of horizontal cell bodies and processes in the OPL are virtually devoid of label while labeling of cells in the amacrine cell layer and IPL remains robust ($\times 550$). (d) exposure to 50 mM potassium caused swelling particularly in glial cell bodies and their processes in the outer retina. Labeling in the OPL is present, although it is significantly decreased compared to control tissue ($\times 350$).

ganglion cell layer are ganglion cells rather than displaced amacrine cells. Chick retina does not show [^3H]GABA accumulation into Muller cells.

The effects of kainic, glutamic and aspartic acid on [^3H]GABA release is shown in Fig. 2. When retinas were superfused in the presence of 200 μM kainic acid, the release of [^3H]GABA was increased by 25.77 ± 3.19 -fold over resting values. Superfusion with 10 mM glutamic acid induced a 18.22 ± 3.27 -fold stimulation of [^3H]GABA basal release. Similar results were obtained when retinas were treated with

aspartic acid. This amino acid, used at a concentration of 10 mM, stimulated [^3H]GABA release by 17.50 ± 6.04 -fold. The amount of [^3H]GABA released by the depolarizing effect of KCl (6.69 ± 1.79 -fold) was less than that elicited by the excitatory amino acids.

Autoradiographs show that label is absent from the OPL and from horizontal cell bodies after retinas were subjected to kainic acid (200 μM) stimulation (Fig. 5a, b). In spite of pronounced swelling throughout most of the INL, note that radioactivity is still



Fig. 6. Autoradiographic localization of [^3H]GABA in rat retina. (a) Stained autoradiogram shows dense labeling of Muller cell bodies in the INL and processes in the NFL ($\times 286$). Heavily exposed, unstained autoradiogram shows labeled, spindle-shaped processes of the Muller cell which extend to the outer limiting membrane (OLM), and labeled foot pads which form the inner limiting membrane (ILM). Labeling is also observed within round cell profiles in the amacrine layer. Some laminarization of label is seen in the IPL ($\times 390$).

present over IPL, as well as amacrine and ganglion cell bodies. Furthermore, distinct lamination is readily observed within the IPL after kainic acid treatment (see Fig. 5b).

Autoradiography of [^3H]GABA preloaded chick retinas in Fig. 5c demonstrates that the effects of glutamate are similar to those observed for kainic acid treatment. However, much less morphological damage is observed in glutamate-treated retinas. Some vacuolization is present in both OPL and IPL; however, chromatolysis within the INL is very limited (Fig. 5c). Labelling of amacrine and ganglion cells as well as sublamina in the IPL is unchanged compared to controls; however, horizontal cells and OPL are devoid of label (Figs. 5c). Similar label distribution and morphological results are observed in retinas perfused with either aspartic acid (2 and 10 mM) of kainic (20 μM) and glutamic acid (2 mM) (not shown).

Superfusion of retinas with 56 mM KCl results in a



Fig. 7. Autoradiograms of [^3H]GABA in rat retina after chemical stimulation. Some swelling is observed within various retinal elements; however, the overall autoradiographic pattern is unchanged from control tissues (Fig. 6a). 200 μM kainic acid to 10 mM glutamate ($\times 220$).

homogeneous reduction of grain density from every cell that previously accumulated [^3H]GABA. Treatment with this depolarizing agent also causes massive swelling of virtually all retinal neurons (Fig. 5d).

Rat retina

Fig. 6a, b shows grain distribution in rat retina after incubation with [^3H]GABA for 15 min. Most of the labelling is localized over Muller cell bodies in the middle of the INL, as well as over Muller cell terminal feet which form the inner limiting membrane. Labelling is also present over glial cell processes throughout the ONL and extending to the outer limiting membrane. In contrast to chick and frog retinas (see Figs. 1 and 3), this mammalian retina does not show

accumulation of [^3H]GABA in horizontal cells or the OPL; however some spherical cell bodies located in amacrine cell layer show a high grain density (Fig. 6).

Superfusion of rat retinas with 200 μM kainic acid after previous incubation in [^3H]GABA for 15 min, failed to evoke a significant increase in [^3H]GABA release (see Fig. 2). Similar results were obtained when retinas were superfused with either glutamic or aspartic acid at various concentrations (2–10 mM). In contrast, addition of 56 mM KCl to the superfusion medium resulted in an increase of 4.26 ± 0.12 -fold over [^3H]GABA basal release values (Fig. 2).

The autoradiograph in Fig. 7a shows the grain distribution in rat retina after kainic acid treatment. The labelling pattern remains unchanged after retinas were superfused with 20 or 200 μM kainic acid. Most of the label is still present over Muller cell bodies and their processes. In these retinas, there is cellular damage in much of the amacrine cell layer, although some cell bodies in the innermost part of the INL remain labelled.

Both glutamate (Fig. 7b) and aspartate (not shown)-treated retinas show a labelling distribution similar to that observed in kainic acid-treated retinas. Cellular damage is markedly pronounced in cells in the amacrine cell layer; however, some cells located in that layer show a high grain density.

Retinas treated with 56 mM KCl do not change their general pattern of labelling; rather there is an overall reduction of grain density (not shown). This treatment causes swelling in most of the cells, as was observed for chick retina (see Fig. 4).

DISCUSSION

Audiographic accumulation of [^3H]GABA accumulating cells in retinas from a variety of species have been well studied. In agreement with previous observations^{11,13}, we find that frog and chick retinas demonstrate an exclusively neuronal distribution of [^3H]GABA uptake. Horizontal cells are most heavily labeled in retinas from both of these species. In the chick retina, other labeled cell populations are located in the amacrine and ganglion cell layers, with a significant accumulation in the IPL. Ganglion cell axons in the nerve fiber layer are also heavily labeled in this species. In contrast, the labeling of cells in the amacrine cell layer and ganglion layer was not appar-

ent in frog retinas. However, another cell type, with cell bodies located in the center of the inner nuclear layer, was heavily labeled. These audiographic patterns are also in agreement with previous publications²⁹. The identity of the cells in the middle of the inner nuclear layer in frog is unknown, although they are likely to be either bipolar cells or interplexiform cells, based on the distribution of labeled processes from the cell which apparently project to both plexiform layers. Uptake of [^3H]GABA into similarly located cells in mudpuppy retina have been interpreted as evidence for the presence of GABAergic bipolar cells³¹. However, electrophysiological and pharmacological evidence suggest that most bipolar cells release excitatory neurotransmitters³⁰ and thus does not support the notion that bipolar cells utilize GABA as an inhibitory neurotransmitter. In cat retina, interplexiform cells have been described which accumulate [^3H]GABA¹⁷. Based on these considerations, it may be possible that these labeled cells in the frog retina are interplexiform cells.

Aspartate, glutamate and kainic acid were found to be potent stimulators of [^3H]GABA release in both the frog and chick retinas. All 3 compounds caused roughly a 20-fold increase in the amount of [^3H]GABA released above baseline levels. This was significantly more stimulation than that seen with 56 mM KCl which was approximately 6-fold for frog and chick retinas. Autoradiographic analysis of tissues after potassium stimulation showed a generalized decrease in labeling of all the labeled cells. In contrast, tissues exposed to glutamate, aspartate or kainic acid showed specific and virtually complete loss of labeling of the horizontal cells, while labeling of other cells remained intact. Labeling of cells in the inner nuclear layer in the frog retina and of cells in the amacrine cell layer and ganglion cell layer in the chick retina, was in fact more readily appreciated in the absence of the heavy label normally associated with horizontal cells under control conditions. A striking example of this phenomena is seen in the complex banding pattern of [^3H]GABA accumulation in the chick retina, which is more readily appreciated after treatment with glutamate, aspartate or kainic acid. No labeling of Muller cells in chick or frog retina was observed under any of our conditions. We conclude from these experiments that horizontal cells show a preferential sensitivity to kainic acid, glutamate and

aspartate. Furthermore, the increased release in [^3H]GABA elicited by these compounds originates primarily from horizontal cells. Other retinal cell types which also accumulate [^3H]GABA, including cells in the middle of the inner nuclear layer and amacrine cell layer, are relatively unaffected by excitatory amino acids and do not show significant loss of labeling when exposed to these compounds.

Autoradiographic analysis of rat retinas showed marked labeling of Muller cells which masked to a large extent the labeling of amacrine and ganglion cells, although it was possible to observe some labeled amacrine cell bodies. As previously reported^{5,7,8}, the differential metabolic rate of [^3H]GABA in Muller vs neuronal cells in the retina, initially results in a predominantly Muller cell pattern of accumulation, which later changes to a neuronal pattern of accumulation with increasing postincubation time. In our release experiments, retinas were incubated in the presence of [^3H]GABA, transferred to superfusion chambers, and perfused so that 20–30 min elapsed between the incubation period and the application of the stimulus. Under these conditions, [^3H]GABA is predominantly localized in neurons, namely, cells in the amacrine and ganglion cell layers. Stimulation of rat retina under these conditions, with glutamate or kainic acid, led to a relatively modest (two-fold) increase in the amount of [^3H]GABA released compared to baseline levels. Addition of 50 mM KCl elicited significantly more release, roughly 4-fold above baseline. The release elicited by glutamate and kainic acid, although significant, is well below that seen in the chick and frog retinas. The autoradiograms of rat retina after glutamate or kainic acid treatment, did not provide a clear demonstration of the cellular source of the released GABA.

It does appear that the distribution of [^3H]GABA, at the conclusion of the stimulation experiment, shows a higher concentration of label associated with Muller cells than is present in unstimulated tissue exposed to the same perfusion time. One explanation for these findings is that a portion of the released GABA may be sequestered through the Muller uptake system and thus remained in the tissue. Therefore, [^3H]GABA measured in the perfusate may represent only a portion of that released by retinal neurons and the remainder may have been taken up by Muller cells, as evidenced by the autoradiograms.

We can conclude from these experiments, however, that in mammalian retina, kainic acid and glutamate, at the relatively high concentrations used, do not deplete either Muller cells or [^3H]GABA neurons of labeled ligand. These findings are in contrast to frog and chick retina horizontal cells, which are depleted under these conditions.

We have recently reported that neonatal rabbit retina exhibits significantly different [^3H]GABA uptake patterns than the adult⁹. Adult rabbit retina exhibits [^3H]GABA accumulation patterns which are virtually indistinguishable from that of adult rat, namely dense labeling of Muller cells with uptake also seen in amacrine cells and their processes in the IPL. Two significant differences were noted in neonatal tissues. First, uptake of [^3H]GABA by Muller cells is significantly less in the neonatal retina than in the adult, and secondly, a population of horizontal cells accumulate GABA. These two differences are not observed after the fifth postnatal day. The neonatal rabbit retina preparation thus provides a mammalian retina which exhibits key GABA-related properties, which are normally expressed in the adult non-mammalian retina. We have begun experiments to determine sensitivity of these neonatal [^3H]GABA-accumulating horizontal cells to excitatory amino acids. Our preliminary results suggest that when neonatal rabbit retinas are preloaded with [^3H]GABA, the observed response is similar to that seen in non-mammalian retinas; namely, massive release of [^3H]GABA is stimulated by these compounds and autoradiographic patterns confirm that the major source of the released GABA is from labeled horizontal cells. Of particular importance is the fact that the labeling of amacrine cells in the neonatal retina is not altered by treatment with glutamate, aspartate or kainic acid. These findings, although preliminary, may provide evidence that the relative lack of stimulated release in the adult rabbit retina and perhaps adult rat, is in fact due to a lack of kainic acid sensitivity of the GABA-accumulating amacrine cells. Furthermore, that the apparent lack of amacrine cell sensitivity is not due to a masking of the release effect by avid Muller cell uptake since neonatal rabbit retina showed little or no loss of label associated with amacrine cells, even in the absence of avid Muller cell uptake.

We conclude that GABA-accumulating amacrine

cells represent part of a relatively small population of amacrine cells which are relatively insensitive to kainic acid and other excitatory amino acid neurotransmitter agents. Our previous autoradiographic studies support this suggestion^{7,8}. We observed *enhanced* [³H]GABA accumulation in amacrine cells of the rabbit retina after *in vitro* incubation in kainic acid. In contrast, uptake of [³H]glutamate by amacrine cells was abolished by this treatment. We also noted the loss of 2 of the 3 bands normally labeled by [³H]dopamine in the IPL of the rabbit after *in vitro* treatment with kainic acid. We interpreted these results to indicate that there may be heterogeneous populations of dopaminergic amacrine cells, consisting of kainic acid-sensitive and kainic acid-insensitive cell types. In our present results, we found no significant change in the distribution of [³H]GABA in the inner retina in response to kainic acid, glutamate or aspartate. For example, the multiple complex banding pattern in chick retina showed no change in overall number or position of labeled laminae. Thus GABAergic amacrine cells behave as a homogenous population with respect to sensitivity to these compounds.

Kainic acid is thought to interact with cells through a membrane receptor which may function physiologically as a subclass of glutamate receptors^{2,11-21}. Cellular responses to kainic acid include depolarization, swelling and necrosis. The proposed kainic acid receptor appears to be responsible for all these cellular responses, which in fact may represent different points on a continuum rather than separate and discrete responses. The effects of glutamate and aspartate could theoretically be mediated through a variety of mechanisms since these compounds not only interact with proposed postsynaptic receptors, but are also taken up and released by retinal neurons^{6,10,22}, and are involved in general amino acid metabolism^{12,13}. However, since the results of all 3 compounds were very similar under all conditions tested, this suggests that the major actions of all 3 compounds may be mediated through postsynaptic receptors. It is tempting to speculate that the observed responses are indicative of the presence or absence of glutamate or aspartate receptors on these different populations of [³H]GABA-accumulating cells. It may be generally agreed, at least in the case of kainic acid, that the responsiveness to kainic acid

can be taken as an indication of the presence of kainic acid receptors. However, the converse may not be equally valid. As suggested by Miller¹⁴, the possible involvement of chloride ions in the expression of one kainic acid response, namely, swelling, may preclude simple interpretations. According to Miller's hypothesis, two components, i.e. kainic receptors and a high permeability to chloride, might be necessary in order for a swelling response to be expressed. The presence of kainic acid receptors alone may not be sufficient to allow swelling to occur. The possible implications of this hypothesis in the interpretation of our data are further confounded by the fact that the release of [³H]GABA may or may not be directly related to the swelling phenomena. Thus, we can only conclude with certainty that excitatory amino acids cause preferential release of [³H]GABA from horizontal cells as compared to other [³H]GABA-accumulating cells in retinas from a variety of species. However, we cannot necessarily conclude that the basis for the differential sensitivity is due solely to the presence or absence of kainic acid receptors or chloride channels.

The only difference we observed in the response to the 3 stimulatory amino acids used in this study was a difference in potency: kainic acid \gg glutamate \gg aspartate. Relatively high concentrations of these agents were used in order to maximize the chances of observing a change in autoradiographic patterns. Under these conditions, we were unable to observe any difference in the sites of action of these compounds. Since these compounds exhibit vastly different uptake and metabolic properties, it is impossible to draw any conclusions regarding the relative density of proposed receptor sites or relative affinities of these compounds for their receptor sites based on our results.

It is of interest to note that the kainic acid sensitivity of GABA-accumulating horizontal cells is a consistent phenomena in not only non-mammalian vertebrate species, but also in at least one mammalian species in which GABA-accumulating cells are present during a transient period of postnatal development⁸. There is growing evidence from several laboratories that photoreceptors release an excitatory amino acid neurotransmitter onto horizontal cells¹⁴. Thus, the release observed in our experiments may, in fact, reflect the stimulated release which occurs in response to the endogenous photoreceptor transmitter. On

the other hand, there is little evidence that other GABAergic cells of the retina, such as amacrine cells, receive direct excitatory input from bipolar cells which are also thought to release an excitatory amino acid neurotransmitter²³. Thus, the relative insensitivity of the other GABAergic cells of the retina may, in fact, reflect the lack of postsynaptic receptors on these populations of cells.

REFERENCES

- Brecha, S., Retinal neurotransmitters: histochemical and biochemical studies. In P. Emsson (Ed.), *Chemical Neuroanatomy*, Raven Press, New York, pp. 85-129.
- Cotman, C.W., Foster, A., and Lanthorn, T., An overview of glutamate as a neurotransmitter. In G. Di Chiara and G.L. Gess (Eds.), *Glutamate as a Neurotransmitter*, *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 27 (1981) 1-27.
- Cunningham, J.R., and Neal, M.J., Effect of excitatory amino acids on γ -aminobutyric acid release from frog horizontal cells. *J. Physiol. (London)*, 362 (1985) 51-67.
- Davies, J., Evans, R.H., Jones, A.W., Smith, D.A.S., and Watkins, J.C., Differential activation and blockade of excitatory amino acid receptors in the mammalian and amphibian central nervous system. *Comp. Biochem. Physiol.*, 27 (1982) 211-224.
- Ehinger, B., Glial and neuronal uptake of GABA, glutamic acid, glutamine and glutathione in the rabbit retina. *Exp. Eye Res.*, 25 (1977) 221-234.
- Foster, A.C., Menal, F.E., Monaghan, G., and Cotman, C.W., Synaptic localization of kainic acid binding sites. *Nature (London)*, 289 (1981) 73-75.
- Hampton, C.K., and Redburn, D.A., Autoradiographic analysis of [³H]glutamate, [³H]dopamine and [³H]GABA accumulation in rabbit retina after kainic acid treatment. *J. Neurosci. Res.*, 9 (1983) 239.
- Hampton, C.K., Garcia, C., and Redburn, D., Localization of kainic acid-sensitive cells in mammalian retina. *J. Neurosci. Res.*, 6 (1981) 99.
- Ishida, A.T., and Fain, G.L., *D*-Aspartate potentiates the effects of γ -glutamate on horizontal cells in goldfish retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78 (1981) 5890.
- Mare, R.E., and Lam, D.M.-K., Uptake of aspartic acid by photoreceptors in the goldfish retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78 (1981) 7185.
- Marshall, J., and Voazen, M.J., An autoradiographic study of the cells accumulating [³H]gamma-aminobutyric acid in the isolated retinas of pigeons and chickens. *Invest. Ophthalmol.*, 13 (1974) 13-162-167.
- Meister, A., Biochemistry of glutamate, glutamine and glutathione. In J. Keler, Jr., S. Garattini, M.R. Kane, W.A. Reynolds and R.J. Wurtman (Eds.), *Advances in Biochemistry and Physiology: Glutamate Acid*, Raven Press, New York, 1979, pp. 64-84.
- Miller, A.M., and Schwartz, E.A., Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the rod retina. *J. Physiol. (London)*, 334 (1983) 325.
- Miller, R.F., and Slaughter, M.M., Excitatory amino acid receptors in the vertebrate retina. In W.W. Morgan (Eds.), *Retinal Transmitters and Modulators: Models for the Brain, Vol. 1*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1985, pp. 123-160.
- Mitchell, C.K., and Redburn, D.A., 2-Amino-4-phosphonobutyric acid and *N*-methyl-D-aspartate differentiate between [³H]glutamate and [³H]aspartate binding sites in bovine retina. *Neurosci. Lett.*, 28 (1981) 241-246.
- Moran, J., Pasantes-Morales, H., Effects of excitatory amino acids, and of their agonists and antagonists, on the release of neurotransmitters from the chick retina. *J. Neurocytol.*, 10 (1983) 261-271.
- Nakamura, Y., McGuire, B.A., and Sterling, P., Interplexiform cells in cat retina: identification by uptake of [³H]aminobutyric acid and serial reconstruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77 (1980) 658-661.
- Neal, M.J., Review: amino acid transmitters in the retina. *Gen. Pharmacol.*, 7 (1976) 321-332.
- Pourchoir, R.G., Goebel, D.J., and McReynolds, J.S., Autoradiographic studies of [³H]glycine, [³H]GABA and [³H]muscimol uptake in the midpuppy retina. *Exp. Eye Res.*, 39 (1984) 69-81.
- Redburn, D.A., and Maites, P., Jr., Postnatal development of [³H]GABA-accumulating cells in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, 243 (1986) 41-57.
- Rowe, J.S., and Ruddock, K.H., Depolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter agonists. *Neurosci. Lett.*, 30 (1982) 251.
- Rowe, J.S., and Ruddock, K.H., Hyperpolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter antagonists. *Neurosci. Lett.*, 30 (1982) 251.
- Slaughter, M.M., and Miller, R.F., An excitatory amino acid antagonist blocks cone-input to sign-conserving, second-order retinal neurons. *Science*, 219 (1983) 1230.
- Slaughter, M.M., and Miller, R.F., Bipolar cells in the midpuppy retina use an excitatory amino acid neurotransmitter. *Nature (London)*, 303 (1981) 537.
- Slaughter, M.M., and Miller, R.F., The role of excitatory amino acid transmitter in the midpuppy retina: an analysis with kainic acid and *N*-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.*, 3 (1983) 1701.
- Slaughter, M.M., and Miller, R.F., 2-Amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Science*, 211 (1981) 182.
- Thomas, T.N., and Redburn, D.A., Uptake of [¹⁴C]aspartic acid and [¹⁴C]glutamic acid by retinal synaptosomal fractions. *J. Neurochem.*, 31 (1978) 63-68.
- Vaughn, J.E., Famiglietti, E.V., Jr., Barber, R.P., Saito, K., Roberts, E., and Ribak, C.E., GABAergic amacrine cells in rat retina: immunocytochemical identification and

- synaptic connectivity, *J. Comp. Neurol.*, 197 (1981) 113-127.
- 29 Voaden, M.J., Marshall, J. and Murani, N., The uptake of [³H]GABA and [³H]glycine by the isolated retina of the frog, *Brain Research*, 67 (1974) 115-132.
- 30 Voaden, M.J., γ -Aminobutyric acid and glycine as retinal neurotransmitters. In S.E. Boming (Ed.), *Transmitters in the Visual Process*, Pergamon Press, Oxford, 1976, 107-125.
- 31 Wu, S.M. and Dowling, J.C., L-Aspartate: evidence for a role in cone photoreceptor transmission in the carp retina, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 75 (1978) 5205.
- 32 Yazulla, S. and Brecha, N., Binding and uptake of the GABA analogue, [³H]muscimol, in the retinas of goldfish and chick, *Invest. Ophthalmol.*, 19 (1980) 1415-1426.
- 33 Yazulla, S., GABAergic synapses in the goldfish retina: an autoradiographic study of [³H]muscimol and [³H]GABA binding, *J. Comp. Neurol.*, 200 (1981) 83-93.

2.3. Interacción de neuronas aminocidérgicas y dopaminérgicas en la retina de los vertebrados.

2.3.1. Introducción

Como se mencionó en secciones previas (ver secc. 1.4.4.5. y 1.4.5.) existen suficientes evidencias que apoyan la posibilidad de que la dopamina funcione como transmisor de algunas células amacrinas e interplexiformes en la retina de los vertebrados. Dichas pruebas comprenden la presencia de la maquinaria enzimática para su síntesis, un sistema de captura muy activo, un sistema de liberación que puede estimularse por distintos mecanismos y la presencia de receptores sinápticos específicos, entre otros.

En el caso de la retina de pollo parece ser que la actividad de la dopamina está restringida únicamente a las células amacrinas, dado que los estudios histoquímicos no han revelado la presencia, en las células interplexiformes, de esta monoamina o de las enzimas relacionadas con su síntesis o degradación.

Existen muchas evidencias, por otra parte, que apoyan la posibilidad de un papel neurotransmisor para los aminoácidos excitadores en la retina de los vertebrados (ver secc. 1.4.1.2. y 1.4.3.2.). Además, algunos estudios ultraestructurales en retinas de mamíferos demuestran que estas células dopaminérgicas amacrinas sólo establecen contacto con otras amacrinas, por lo que constituyen células interamacrinas sin influencia directa de células bipolares o ganglionares (Ehinger, 1983), lo que hace pensar que es poco factible la existencia de interacciones aminocidérgicas excitadoras a partir de células

del tipo de las bipolares con estas amacrinas dopaminérgicas. Por otra parte, la información a este respecto ha sido obtenida en su mayoría a partir de estudios en retinas de peces y mamíferos y existe poca información sobre la interacción entre las neuronas aminoacídicas y dopaminérgicas en la retina de aves.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en un estudio de superfusión llevado a cabo con la finalidad de conocer las posibles relaciones entre estos dos grupos de neuronas en la retina de pollo.

2.3.2. Efecto de los aminoácidos excitadores sobre la liberación de dopamina-H₃ en la retina de pollo.

La metodología empleada constituye básicamente la misma que la descrita en las secciones previas. Las retinas incubadas en presencia de dopamina-H₃ se superfundieron con los distintos medios conteniendo agentes despolarizantes después de haber conseguido una línea basal de liberación constante. Todos los medios de incubación y superfusión se suplementaron con pargilina (10⁻⁷M) y ácido ascórbico (0.1 mg/ml) para inhibir la degradación enzimática y la oxidación de la dopamina.

La tabla 1 muestra el efecto del glutamato, kainato, aspartato y KCl sobre la liberación de dopamina-H₃ en retina de pollo adulto. Cuando las retinas se superfundieron con glutamato, N-metil D-aspartato (2 mM) o ácido fólico (100 μ M) no se modificó la liberación de dopamina-H₃. El incremento en la concentración de glutamato y NMDA (10 mM) o de kainato (0.5 mM) tuvieron efectos similares sobre la liberación (no se muestra).

Sin embargo, en experimentos paralelos a los anteriores, la presencia de concentraciones despolarizantes de KCl indujo una estimulación en la liberación de dopamina-H³ del orden de 312.6 ± 31.1% (tabla I).

TABLA I. Efecto del glutamato (2 mM), N-metil D-aspartato (NMDA) (2 mM), kainato (2 mM) y KCl (56 mM) sobre la liberación de dopamina-H³ en retina de pollo adulto.

Las retinas se preincubaron con dopamina-H³ y se perfundieron con los medios conteniendo los diferentes agentes estimulantes. Los resultados están expresados como el porcentaje de estimulación de la liberación sobre la línea basal ± E.E. El número de experimentos se indica en (n).

| AGENTES ESTIMULANTES | LIBERACION DE DOPAMINA (% de estimulación) | (n) |
|----------------------|---|-----|
| Acido glutámico | 0 | 6 |
| Acido kainico | 0 | 5 |
| NMDA | 0 | 3 |
| KCl | 312.6 ± 31.1 | 15 |

A partir de una serie de evidencias bioquímicas y electrofisiológicas se sabe que tanto la dopamina como los aminoácidos excitadores funcionan como neurotransmisores en la retina de los vertebrados. Como ha sido sugerido por Ehinger (1982, 1983) para otras especies de vertebrados, nuestros resultados indican que en la retina de pollo no existen neuronas dopaminérgicas que reciban entradas sinápticas de neuronas aminoacidérgicas excitadoras, dado que ni el glutamato ni sus analogos afectaron la liberación de esta catecolamina (Tabla I). El efecto estimulante del KCl sobre la liberación de dopamina indica que

las retinas acumulan dopamina, que ésta puede ser liberada bajo estimulación por KCl y que en nuestra preparación las células dopaminérgicas se encuentran funcionalmente activas, al menos en lo referente a los mecanismos de liberación.

La dopamina liberada por acción del KCl proviene muy probablemente de las células amacrinas dado que en esta especie los estudios histoquímicos han revelado sólo la presencia de células dopaminérgicas interplexiformes.

Esta serie de resultados coinciden con los encontrados en otras especies y concuerdan con los estudios de Ehinger, quien sugiere que las células interamacrinas dopaminérgicas reciben contactos sinápticos de amacrinas GABAérgicas y glicinérgicas y no están conectadas directamente con bipolares o ganglionares, posibles neuronas aminoacidérgicas (Ehinger, 1982: 1983).

2.4. Interacción de neurotransmisores en la retina de los vertebrados durante el desarrollo embrionario.

2.4.1. Introducción

El estudio del desarrollo de la retina ha sido de gran utilidad para conocer algunos de los aspectos más importantes de la neurogénesis del SNC. Todos los eventos que ocurren en el desarrollo del SNC, tales como la proliferación, migración, diferenciación, formación de contactos específicos y muerte celular, se presentan durante la histogénesis de la retina. Además, en este tejido se llevan a cabo procesos de maduración altamente específicos como la diferenciación de los fotorreceptores y las células gliales. Sin embargo, al igual que para el cerebro, existen todavía muchos incógnitas por resolver como serían el control de la proliferación celular, los factores que controlan la migración, la secuencia de procesos en la formación de contactos sinápticos o el significado de la muerte celular, entre otros.

Una gran parte de la información disponible al respecto ha sido el resultado de los extensos estudios morfológicos llevados a cabo desde finales del siglo pasado. Sin embargo, en los últimos años se han logrado avances sobre muchas de las interrogantes que existen acerca del desarrollo del SNC. Esto ha sido posible, en gran parte, por la aplicación de estrategias experimentales multidisciplinares.

2.4.2. Aspectos morfológicos

En la presente sección se mencionaran algunos de los aspectos más generales sobre la morfología de la retina en el desarrollo

tomando como modelo a la retina de pollo, considerando por una parte, que la mayor cantidad de información existente está basada principalmente en esa especie. Por otra parte, una serie de evidencias que demuestran que los eventos secuenciales y los procesos del desarrollo de la retina es muy similar en todas las especies de vertebrados (Meller, 1984).

Durante el proceso de la neurulación, la invaginación de las copas ópticas produce dos capas de células de origen ectodérmico. La retina neural deriva de la capa interna, mientras que la capa externa da lugar al epitelio pigmentario. Durante la primera fase del desarrollo, la capa interna aumenta su grosor por proliferación celular quedando localizadas las figuras mitóticas en la región ventricular del neuroepitelio (Meller, 1984).

Durante el estado proliferativo, las células embrionarias desarrollan uniones comunicantes que desaparecen después de un periodo corto de tiempo, lo que coincide con la formación de elementos neuronales identificables como las células anacrinas y ganglionares. Probablemente tales uniones participan en la transferencia de información que regula la proliferación y diferenciación entre estas células (Hayes, 1977).

Se ha sugerido que todas las células de la retina se originan al mismo tiempo y que posteriormente migran a sus respectivas capas (Sidman, 1961); sin embargo, algunos estudios más recientes indican que existe una secuencia temporal en la migración de los diferentes tipos neuronales. Kahn (1974) demostró en la retina de pollo que las primeras células postmitóticas que migran son las células ganglionares, seguidas

por las células precursoras de las amacrinas, horizontales y fotorreceptores, mientras que las células bipolares y gliales son las últimas en alcanzar el estado postmitótico.

La finalización de los ciclos mitóticos parece ser una señal para el inicio de la migración de células desde la matriz a la zona marginal, así como para la transformación de las características citoplasmáticas que le da a la célula un aspecto morfológico semejante al del adulto (Meller, 1984). Como consecuencia de la migración de las células a la zona vitreal, algunas neuronas desarrollan prolongaciones y arborizaciones que forman la capa plexiforme interna. Una semana después se forma la la capa plexiforme externa con las arborizaciones de las células bipolares y la parte basal de los fotorreceptores (Meller y Tetzloff, 1976).

Los primeros signos de diferenciación del fotorreceptor tienen lugar durante la segunda semana de incubación, entre el día 9 y 10, cuando el segmento externo se extiende hacia el espacio subretinal. En el día 12 este segmento desarrolla regiones ovales y elipsoides inmaduras que empiezan a elongarse entre los días 15 y 16. Las primeras zonas de contacto sináptico aparecen al rededor del día 14, haciéndose evidente la presencia de material electrodensito. Dos días después aparece el ribete sináptico (McLaughlin, 1976) y entre los días 18 y 19 el citoplasma basal muestra un número considerable de vesículas sinápticas. Las primeras sinapsis de la vía receptor-bipolar horizontal ocurre en la última semana de incubación (Hughes y La Velle, 1974). En el día 18 de incubación los segmentos externos empiezan a elongarse y el fotorreceptor toma rápidamente la

apariciencia madura típica.

Las células horizontales se retiran del ciclo mitótico entre los días 12 y 15 de incubación y su diferenciación ocurre simultáneamente con la del fotorreceptor. Al final de la segunda semana estas células desarrollan prolongaciones apicales hacia la capa plexiforme externa (Møller, 1984).

Las células amacrinas migran junto con las células ganglionares hacia la parte más externa y posteriormente vuelven a migrar hacia la zona vitreal en la parte más interna de la capa nuclear interna. Alrededor del noveno y décimo día de incubación se pueden observar las primeras células amacrinas en la parte basal de la capa nuclear interna (Møller, 1984).

Las células ganglionares son las primeras en retirarse del ciclo mitótico y en consecuencia las primeras en diferenciarse. En el pollo, la mayoría de estas células migran hacia el séptimo y octavo día de incubación; sin embargo, todavía pueden encontrarse células precursoras de las ganglionares dividiéndose hacia el día doce (Møller, 1984). Inmediatamente después de la migración, las células ganglionares inician el crecimiento de las proyecciones retinotectales, las cuales se ha sugerido que se establecen por la migración de las neuritas utilizando las prolongaciones gliales como guía. Se cree que las conexiones retinotectales juegan un papel crucial en la sobrevivencia de las fibras ganglionares (Møller, 1984; Rager y Rager, 1976).

Las células gliales de Müller se pueden identificar estructuralmente hasta el final de la primera semana de incubación. Durante la diferenciación del fotorreceptor, las células de Müller extienden prolongaciones finas que se

intercalan entre las porciones basales de los receptores adyacentes. Estas células forman ramificaciones que envuelven a las neuronas bipolares al nivel de sus somas. El pie basal de las células de Müller se orienta paralelo al haz de neuritas de la capa de fibras ópticas que, como ya se mencionó, pueden servir de guía a dichas fibras. Al final del último día de incubación estas células forman prolongaciones finas de mielina al rededor de las fibras ópticas (Meiler, 1984)

2.4.3. Aspectos Neuroquímicos

Una de las principales características durante el desarrollo del SNC es la aparición y maduración de sistemas de neurotransmisores en las diferentes neuronas.

Recientemente, una serie de estudios han mostrado que ciertos transmisores pueden ser usados como indicadores fisiológicos para seguir la diferenciación de neuronas específicas en la retina de los vertebrados. Los datos obtenidos sugieren que las propiedades neuronales específicas para cada neurotransmisor, como síntesis, captura, liberación, etc. aparecen y maduran en una secuencia temporal precisa durante el desarrollo de la retina.

Los patrones de maduración de las neuronas dopaminérgicas, glicinérgicas y GABAérgicas muestran la aparición inicial de los procesos de acumulación del transmisor seguida por la síntesis y finalmente la liberación del compuesto (Hollyfield et al., 1980; Lam et al., 1980; 1981; Kong et al., 1980). Por otra parte, existe también una aparición secuencial de cada uno de estos sistemas de neurotransmisores. Así a partir de los

estudios de Lam y cols. (Lam et al., 1980; Si; Hollyfield et al., 1980) se ha encontrado que las propiedades fisiológicas de las células GABAérgicas aparecen primero, seguidas casi inmediatamente por las glicinérgicas. Las propiedades fisiológicas dopaminérgicas maduran más tardíamente.

En la retina de conejo (Lam et al., 1980) se ha observado que la acumulación de GABA-H₂ es difusa a lo largo de la capa plexiforme interna al día del nacimiento, apareciendo una banda densa en la capa más interna de esta capa alrededor del día 3. En el día 5, los niveles endógenos de GABA, la actividad de la enzima que lo sintetiza (GAD), y la liberación de GABA estimulada por K⁺ alcanzan del 20 al 25% de los niveles del adulto. Dos o tres días después de la maduración de los sistemas de liberación del GABA aparecen los receptores postsinápticos (Redburn y Mitchell, 1981; Madtes y Redburn, 1982). En estos estudios, se sugiere un papel importante de las células GABAérgicas en la organización de los campos receptivos de las células ganglionares.

Se ha sugerido que la etapa importante en la formación de la sinapsis es la adquisición de los mecanismos para la liberación del neurotransmisor apropiado. Para que dicha liberación pueda ocurrir es necesaria la presencia de sistemas de acumulación del transmisor o precursores de este, síntesis del neurotransmisor, mecanismos de liberación y de recepción o transducción de un estímulo despolarizante. Esto implicaría que al momento de la liberación, este sistema neural habría alcanzado un grado de madurez avanzado. Es por esta razón que en muchos estudios se utiliza el parámetro de la liberación como índice de la madurez

neuronal.

En un estudio reciente, Redburn y Madtes (1986) encontraron que la retina de conejo recién nacido exhibía un patrón de distribución de la captura de GABA-H3 muy diferente al del adulto. La acumulación en recién nacidos es muy semejante a la encontrada en la retina de otros vertebrados adultos como la rana y el pollo (sección II.2.2.3.). Estos resultados coinciden con los estudios de Osborne y cols. (1986) quienes encontraron en la misma especie, mediante el uso de anticuerpos contra el GABA, un patrón de distribución muy similar de este aminoácido. Por otra parte, Schutzer y Ruboif (1984) detectaron con técnicas inmunohistoquímicas la presencia de la enzima glutamato descarboxilasa en algunas células horizontales de ratones menores de 4 semanas de edad. Así, la retina inmadura de conejo posee ciertas características GABAérgicas que están presentes en la retina madura de algunas especies no mamíferas y que pierde a lo largo del desarrollo.

Basados en esta serie de evidencias, utilizando técnicas bioquímicas y de autorradiografía, en el presente trabajo estudiamos la sensibilidad a los aminoácidos excitadores de estas neuronas GABAérgicas inmaduras, tomando como antecedente el hecho de que en las retinas de rana y pollo las células correspondientes mostraron una alta sensibilidad ante dichos compuestos., como ya se discutió en secciones previas.

En la siguiente sección se muestran los resultados obtenidos en dichos estudios.

**STIMULATORY EFFECT OF KAINIC AND GLUTAMIC ACID ON ³H-GABA
RELEASE FROM DEVELOPING RABBIT RETINA**

by

Julio Morán†, Herminia Pasantes-Morales* and Dianna A. Redburn†

†Department of Neurobiology and Anatomy
University of Texas Medical School at Houston
Houston, Texas 77025

and

*Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-600
04510 México, D.F.

ABSTRACT

The stimulatory effect of kainic acid and glutamic acid on the release of ³H-GABA from the developing rabbit retina was examined. In the adult retina kainic and glutamic acid fail to evoke a release of ³H-GABA. In the newborn retina, kainic acid (10^{-6} M) increases the release of GABA by almost eightfold, and this effect decreases with maturation, being threefold and two fold at days 5 and 10 respectively, and of only 1.5 fold at day 20 of postnatal development. The stimulatory effect of kainic acid was always calcium-independent. Glutamic acid (2.5 μM) evokes an 80% increase of ³H-GABA release in the immature retina and the effect decreases with increasing age. The basal release of ³H-GABA shows an opposite pattern, increasing with development. The decline in the stimulatory effect of the excitatory compounds is coincident with modification in the neuronal accumulation of ³H-GABA. In the newborn retina, labelling is found preferentially at the horizontal cells and as maturation progresses, ³H-GABA is accumulated in amacrine cells and Muller cells, whereas labelling is lost from horizontal cells. The autoradiographic analysis of ³H-GABA distribution in retinas superfused with kainic acid suggests that the kainic acid-sensitive pool of releasable GABA is located at the horizontal cell layer, and that maturational processes lead these cells to change some of their biochemical properties, such as the uptake and release of GABA.

KEY WORDS: Retinal development GABA release rabbit retina
glutamate-kainic acid.

INTRODUCTION

There is substantial evidence suggesting a role for GABA as an inhibitory neurotransmitter in vertebrate retina^{1,2,3}. With basis on the criteria of soluble accumulation^{4,5,6}, depolarizing induced, calcium dependent release^{7,8}, presence of enzymes for biosynthesis⁹ and electrophysiological responses^{3,4}, GABAergic retinal neurons have been identified. However, species differences exist in the sense that horizontal cells and amacrine cells are considered GABAergic neurons in nonmammalian retinas^{10,11} whereas in mammalian retinas only amacrine cell seems to use GABA as neurotransmitter^{3,4,12}. Differences may also exist between mature and immature retinas of the same species. In adult rabbit retina, GABA is accumulated by amacrine cells but not by horizontal cells, whereas in the developing retina, the pattern of GABA-accumulating cells is similar to that found in adult nonmammalian retinas, i.e. GABA is taken up by both horizontal and amacrine cells¹³. This observation may suggest that the organization of some functional synapses in the immature mammalian retina is transiently similar to that of nonmammalian retinas.

To test this possibility, using biochemical and autoradiographical approaches, we have examined in the present work the effect of the excitatory compounds, kainic (KA) and glutamic (GLU) acids, on the release of GABA from the developing rabbit retina. These agents are most probably acting through synaptic receptors for the neurotransmitters released from photoreceptors and some bipolar cells^{3,5,12,13,14,15}. We have previously shown¹¹ that these compounds elicit the release of

GABA free horizontal cells in chick and frog retina, whereas this is not observed in rat and rabbit retina. The question then raises whether 3H-GABA-accumulating cells in the immature retina respond to the effect of the excitatory amino acids, in the way they do in the adult frog and chick retina.

METHODS

New Zealand white rabbits (1-20 days old) were sacrificed by decapitation and retinas immediately removed. Tissue was transferred in to a Krebs bicarbonate medium (NaCl2, 118mM; KCl, 4.7mM; KH2PO4, 1.17mM; CaCl2, 2.5mM; MgSO4, 1.0mM; NaH2PO4, 25mM; glucose, 11.1 mM) and incubated in a shaking bath at 37°C. After 5 min. of incubation 3H-GABA (50 µCi/ml; 0.4 µM final conc.) was added and the incubation continued for 15 min. Both incubation and superfusion media contained 10⁻⁷ M picrotoxinic acid to inhibit GABA receptors. After incubation, retinas were immediately washed and superfused at a flow rate of 0.6 ml/min with the Krebs medium for a period of 17 min and then superfusion continued with the same medium containing glutamate, bicinate or depolarizing concentrations of KCl (55 mM). Fractions of the superfusate were collected at 1 min intervals and the radioactivity of collected fractions was measured after addition of Trifluor. At the end of the superfusion the retina was sectioned in two pieces, one for analysis of the remaining radioactivity and the other one for autoradiographic examination. Radioactivity was measured after digestion of the tissue with NCS.

For autoradiography, retinas incubated with 3H-GABA or after

superfusion, were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M cacodylate buffer, pH 7.2 at 4°C overnight. Tissue was processed for microscopy, by postfixation with 1% OsO₄, dehydration in ethanol and propylene oxide, and embedding in Epon. Sections of 1 µm thick were placed on slides and dipped in Kodak NTB-2 nuclear track emulsion diluted with water (1:1). Sections were exposed for 2-3 weeks.

RESULTS

Uptake of ³H-GABA in developing retinas

Table I shows the accumulation of ³H-GABA by the rabbit retina at 1, 5, 10 and 20 days of postnatal development. No appreciable differences were observed through day 1 to 10, when radioactivity accumulated by retinas amounted 260-300 dpm/µg prot. From day 10 to 20, a increase of 37% of ³H-GABA accumulation was observed (Table I).

Autoradiographic localization of GABA-accumulating neurons

Autoradiograph of retina from 3-day old rabbit after a 15 min incubation is shown in Figure 1. Note that at this developmental stage most of the neurons are still immature, showing elongated cell bodies and dark nuclei. Photoreceptors are also immature and outer segments have not differentiated. Some neurons in horizontal cell position, however, have a mature appearance showing rounded cell bodies and clear nuclei (Fig. 1). All these mature horizontal cells were labeled by ³H-GABA (upper arrows). Other labeled cell bodies are localized on the ganglion cell position (lower arrows) and in the middle of the inner nuclear

layer (middle arrow). Also, some cells on ganglion cell layer show some grains over their bodies (double arrow). Labeling of glial Müller cells are not detected.

Figure 2 shows labeling pattern of 35 S GABA in 3 day old rabbit retina after superfusion with 100 μ M kainic acid. Treatment with kainic acid induced a pronounced swelling in horizontal cell bodies and in cells localized on amacrine cell layer as well as elements of the inner plexiform layer. It can be appreciated the loss of labeling from mature horizontal cells and probably from some amacrine cells although it is difficult to determine if all labeling is lost (compare with Fig. 1). In contrast, grain silver distribution over cells in the middle of inner nuclear layer and ganglion cell layer seem not to be affected by kainic acid treatment (arrows).

Labeling pattern of adult rabbit retina preloaded with 35 S GABA for 15 min is shown in figure 3. Most of the label is present in Müller cell bodies in the inner nuclear layer and their processes running throughout outer nuclear layer and extending to the outer limiting membrane in photoreceptor layer. Some silver grains can be appreciated over cell bodies in amacrine and ganglion cell layers (arrows). Note the absence of label in horizontal cell bodies.

The autoradiograph in Figure 4 shows the grain distribution in adult rabbit retina after treatment with 100 μ M kainic acid. Pronounced swelling is observed in horizontal and amacrine cells, and elements of the inner plexiform layer. Labeling pattern of Müller cells is not affected by kainate (arrows). Labeling of some amacrine cells may remain intact (compare with Figure 3).

Release of ^{3}H -GABA

^{3}H -GABA released from retinas was calculated as the percentage of radioactivity released per min of total ^{3}H -GABA taken up by retinas. ^{3}H -GABA-stimulated release was expressed as the ratio between basal release and maximal release evoked by KA, glu or KCl.

Figure 5 shows the effect of 0.1 μ M kainic acid (KA) on ^{3}H -GABA release from rabbit retina at 1, 5, 10, and 20 days of age. At one day, KA evoked a ^{3}H -GABA release of 8.75 fold the resting values. An increase in the age of the animal led to a progressive decrease in the amount of ^{3}H -GABA release in presence of the same concentration of KA. Thus, ^{3}H -GABA release was stimulated by 2.8, 1.4 y 1.2 fold at 5, 10, and 20 days of age, respectively. Concurrently to increasing age of retinas, an enhancement of resting values of ^{3}H -GABA release is observed from day 1 to 20 (Fig. 5).

The effect of calcium on the KA-stimulated release of ^{3}H -GABA was examined at different ages by adding 10 μ M $CaCl_2$ to superfusion media. Blockade of calcium fluxes by magnesium failed to modify the KA-stimulated release of ^{3}H -GABA at all ages studied (Fig. 6). Similarly, high magnesium did not affect the basal release of ^{3}H -GABA from both adult and newborn retinas (not shown).

Glutamic acid, at a concentration of 2 μ M, induced an increase on the release of ^{3}H -GABA of 1.42 ± 0.11 fold the basal values at 1 day of postnatal development (not shown). As for KA, the potency of glu to evoke ^{3}H -GABA efflux decreased with age. At day 20, ^{3}H -GABA-stimulated release by glu was reduced to 1.11 ± 0.01

fold.

The effect of depolarizing concentration of potassium on the release of ³H-GABA from developing rabbit retina was examined in parallel experiments. The release of ³H-GABA in the presence of high potassium increased by about 45.7 ± 1.2% at the first day of age, and it was not substantially modified during development until day 30 when potassium-stimulated release amounted 55.3 ± 2.6% resting value (Fig. 6). The potassium-stimulated release of ³H-GABA was found to be calcium-dependent at all ages examined. The decrease of ³H-GABA release in a magnesium-containing medium was approximate to 50% at day 1, whereas under the same conditions ³H-GABA release was reduced 90% approx. at day 30 (Fig. 6).

DISCUSSION

The results of the present study show that in the rabbit retina the ability of the excitatory amino acids KA and GLU to elicit the release of ³H-GABA markedly changes during development. In contrast to the small release of ³H-GABA observed in the adult, a massive release is observed in the first days after birth in the presence of KA, and also a significant efflux in the presence of GLU. Coincidentally, the cellular distribution of accumulation of ³H-GABA in the developing retina also shows substantial modifications. The large accumulation of ³H-GABA observed in horizontal cells within days 1-5 of postnatal development, disappears as maturation progresses. At the same time, increasing labelling occurs in amacrine and Muller cells. These maturational changes occur coincidentally in time suggesting

a relationship between the two events. Thus, while ³H-GABA accumulates mainly in the horizontal cells, maximal response to KA is observed and by the time when labeled GABA disappears from these cells and becomes concentrated in amacrine and Muller cells, the response to KA and GLU is almost abolished. The fact that massive KA-stimulated GABA release occurs when practically no label is present in Muller cells, whereas the response to KA is much lower by the time when Muller cells are densely labeled, strongly suggests a poor or little participation of the glial cells in the KA induced release of GABA. Muller cells, in contrast, may be responsible for the progressive increase of the resting release of ³H-GABA observed during retinal development, since it is known that glial cells have lower retention of neuroactive substances as compared to neurons. The accumulation of ³H-GABA by amacrine cells is also delayed with respect to the stimulatory effect of KA. These observations point out on horizontal cells as preferential sites for ³H-GABA release upon KA and GLU stimulation. This suggestion is further supported by the autoradiographic analysis carried out in the present study showing that the amount of ³H-GABA in horizontal cells decreased in retina perfused with KA.

Although GLU would be expected to have a quantitatively similar effect as KA, its lower potency in stimulating the release of GABA may be a consequence of a higher effectiveness in the uptake system for GLU than for KA and/or to a higher affinity of synaptic receptors for KA as compared to GLU.

Parallel to modifications in the sensitivity of GABAergic cells to the stimulatory effect of the excitatory amino acids,

the release of GABA stimulated by depolarising concentrations of K^+ , which shows a moderate increase during development, also exhibits maturational changes. The K^+ -stimulated release of GABA at day 20 is markedly calcium-dependent, whereas at day 1 it is only partially calcium-dependent. From the observations discussed above on the developing pattern of 3H-GABA accumulating cells, it may be suggested that these maturational changes in calcium dependency are due to a decline in the efflux of the amino acid from horizontal cells, which is a calcium-independent process, to an increase in pools of GABA responding to potassium through a calcium-dependent chloride secretion coupling. The cellular site of these calcium-dependent releasing pools may be a population of amacrine cells, which show an increasing ability to accumulate GABA, coincident with the development of the calcium-dependent K^+ -stimulated release of GABA, characteristic of the mature retina. The remaining calcium-independent component of the depolarising induced response, may be accounted by GABA accumulated in Muller cells, which are known to respond to K^+ -depolarisation by a calcium-independent process^{11,12}.

The above observations taken together, lead to the conclusion that a population of GABAergic horizontal cells present in the developing retina, disappear at later stages of development. Their ultimate fate may include migration, displacement or replacement by other cells or death. Alternatively, they may persist as the original cell population but now communicating through electrical connections or by chemical neurotransmitter other than GABA. From these possibilities, migration or displacement seem unlikely, since no GABAergic cells sensitive to

KA are found in the adult retina. Moreover, adult rabbit retina shows a KA-sensitive cell distribution which is very similar to that found in newborn rabbit retina, including KA-sensitive horizontal cells. This suggests that the pattern of distribution of KA-sensitive cells do not change substantially its location during the maturation process. Regarding a possible change in neurotransmitter, at present no other chemical has been identified at the horizontal cells of the rabbit retina. On the other hand, extensive gap junctions between horizontal cells have been demonstrated in general, particularly in rabbit retina¹⁷. Through these structures electrically functional, low resistance contacts may occur, which may effectively replace chemical communication. A selective loss of these GABAergic horizontal cells cannot be ruled out. Cell death is known to occur as part of the developmental programming of nervous organization, concordant to the final establishment of functional circuitry¹⁸.

An intriguing observation concerning the findings of this work is that in the adult chick and frog retina horizontal cells exhibit remarkable similarities with the lamprore cells of the rabbit retina, both in the accumulation of GABA and its release by KA and glut. It is tempting to speculate on the existence of an evolutionary trend including a reorganization of chemical synapses as consequence of the establishment of more complex visual areas in the brain.

Acknowledgements: This work was supported by grant RR1-EYO 1655-10 from NIH to D.A.R. and RR1-EYO 2540-07 from NIH and FCSABNA 036775 from CONACYT to H.P.H.

REFERENCES

1. Blockfield, G.O. and Miller, R.F. A physiological and morphological study of the horizontal cell types of the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 200(1982) 288-307.
2. Brandon, G., Lee, S.H.K. and Ho, J.Y. The gamma-aminobutyric Acid uptake system in rabbit retinal localization by immunocytochemistry and autoradiography. *Proc. Intl. Acad. Sci. U.S.A.* 74(1976) 2557-2561.
3. Caldwell, J.H. and Dow, H.H. Effects of picrotoxin and strychnine on rabbit retinal ganglion cells: Changes in spontaneous receptive fields. *J. Physiol.* 274(1978) 227-249.
4. Caldwell, J.H., Dow, H.H. and Hyslop, H.J. Effects of picrotoxin and strychnine on rabbit retinal ganglion cells: Lateral interactions for cells with some complex receptive fields. *J. Physiol.* 274(1978) 277-299.
5. Dechant, S.F. and Davinia, E. Horizontal cells in the retina of the rabbit. *J. Neurosci.* 2(1982) 1424-1428.
6. Eninger, B. Cellular localization of the uptake of some amino acids into the rabbit retina. *Brain Res.* 43(1972) 277-281.
7. Hampton, G.M., Garcia, Ch. and Redburn, D. Localization of kainic acid-sensitive cells in mammalian retina. *J. Neurosci. Res.* 4(1981) 22-31.
8. Hampton, G.M. and Redburn, D. Autoradiographic analysis of ³H-glutamate, ³H-depolarine and ³H-GABA accumulation in rabbit retina after kainic acid treatment. *J. Neurosci. Res.* 2(1982) 272-281.
9. Kolb, H. Degeneration of the outer plexiform layer in the cat: An electroretinographic observation. *J. Neurobiol.* 6(1977) 171-187.
10. Miller, R.F. and Slaughter, N.M. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate retina. In: *Retinal Transmitters and Modulators: Models for the Brain* (H.H. Morgan, ed.) C.R.C. Press, Inc., Boca Raton, FL (1979) vol. 11, pp. 123-140.
11. Morgan, J.J., Dichter, M., and Redburn, D. Glutamate receptor agonists release ³H-GABA preferentially from horizontal cells. *Brain Res.* 1984. In press.
12. Morgan, J.J. Kainic acid as a tool in retinal research. In: *Progress in Retinal Research* (N.N. Osborne and G.J. Chader, eds.) Pergamon Press, Ltd., Oxford, (1983) vol. 2,

13. Neal, M.J. Review: Owing acids transmitters in the retina. *Gen. Pharm.* 7(1976) 321-332.
14. Neal, M.J. and Bowers, N.G. Differential effects of veratridine and picrotoxin depolarization on neuronal and glial release. *Brain Res.* 167(1978) 337-347.
15. Oppenheim, R.H. Neuronal cell death and some related regressive phenomena during neurogenesis: A selective histological marker and a preliminary report. In: *Studies in Developmental Neurobiology: Essays in honor of Victor Hamburger* (M.H. Cohen, ed.) Oxford University Press, New York, (1981), pp.74-127.
16. Redburn, D. Uptake and release 14C-GABA from rabbit retina synaptosomes. *Exp't Eye Res.* 25(1977) 255-275.
17. Redburn, D. and Madtes, P. Postnatal development of 3H-GABA-accumulating cells in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 243(1984) 41-57.
18. Sellstrom, A. and Hansberger, A. Potassium stimulated α -aminobutyric acid release from neurons and glia. *Brain Res.* 119(1976) 169-173.
19. Slaughter, M.M. and Miller, R.F. Bipolar cells in the mudpuppy retina are an excitatory amino acid neurotransmitter. *Nature (London)* 307(1983) 537-539.
20. Slaughter, M.M. and Miller, R.F. The role of excitatory amino acid neurotransmitter in the mudpuppy retina: An analysis with kainic acid and dimethyl aspartate. *J. Neurosci.* 3(1983) 1704-1714.
21. Vanden, M.J. α -aminobutyric acid and glycine as retinal neurotransmitters. In: *Transmitters in the Visual Process*. (S.F. Evinger, ed.) Pergamon Press, Oxford (1974) pp. 107-125.

Figure legends

Figure 1. Autoradiographic localization of ³H-GABA in retina from 2-day old rabbit incubated with ³H-GABA in vitro for 15 min. Labeling is noted in mature horizontal cell bodies (upper arrows), immature cell bodies in the developing inner nuclear layer (middle arrows), amacrine cell bodies (lower arrows), and elements of ganglion cell layer (double arrows).

Figure 2. Effect of 100 μ M lactic acid on ³H-GABA distribution in retina from 2-day old rabbit. Pronounced swelling is noted in horizontal cell bodies, cells in the amacrine layer and elements of the inner plexiform layer. Labeling in the horizontal cells has been lost after lactic acid treatment (compare with Fig. 1). Some labeling within the inner nuclear layer remains. In contrast, labeling in ganglion cell elements is still present (arrows).

Figure 3. Autoradiographic localization of ³H-GABA in retina from adult rabbit. Labeling is located primarily in Müller cells although some amacrine cell labeling can be appreciated (arrows).

Figure 4. Effect of 100 μ M lactic acid treatment on ³H-GABA distribution in retinas from adult rabbit. Pronounced swelling is observed in horizontal cells, many amacrine cells and elements of the inner plexiform layer. Labeling of Müller cells is not affected by lactic acid (compare with Fig. 3). Labeling in some amacrine cells remains intact.

Figure 5. The effect of kainic acid on the release of ^3H -GABA from the developing rabbit retina. The retinas were incubated with ^3H -GABA and superfused with a Krebs bicarbonate buffer as describe in Methods. A representative experiment (curves) shows the spontaneous release of ^3H -GABA and the effect of superfusion with a buffer containing 100 μM kainic acid (shaded bar) in retinas at 1, 5, 10 and 20 days of age. Black bars in the insert are the mean \pm S.E.M. ($n=4$) of the ratio of radioactivity values at the peak release in the presence of kainic acid and the value at the baseline prior stimulation.

Figure 6. The effect of blockade of calcium fluxes on the release of ^3H -GABA stimulated by kainic acid (A) and by depolarizing concentrations of KCl(B). The retinas were superfused with a Krebs bicarbonate sodium containing 1.2 μM or 10.0 μM magnesium. Results are expressed as the percentage increase of radioactivity released at the maximal stimulatory effect over the value at the baseline prior stimulation. Results are the mean \pm S.E.M. of 4-5 separate experiments.

TABLE I

³H-GABA accumulation in rabbit retina at 1, 5, 10 and 20 days of age.

Whole retinas were incubated with ³H-GABA at 36 °C for 15 min and washed with standard medium. Radioactivity accumulated by the tissue was measured after digestion of retinas with NCS. Values are mean ± S.E.M. of the number of experiments in parenthesis.

| Age (days) | ³ H-GABA accumulation (dpm/µg prot.) |
|------------|--|
| 1 | 270.0 ± 24.8 (10) |
| 5 | 278.0 ± 45.8 (10) |
| 10 | 241.0 ± 38.5 (11) |
| 20 | 359.2 ± 41.1 (20) |



FIGURA 1

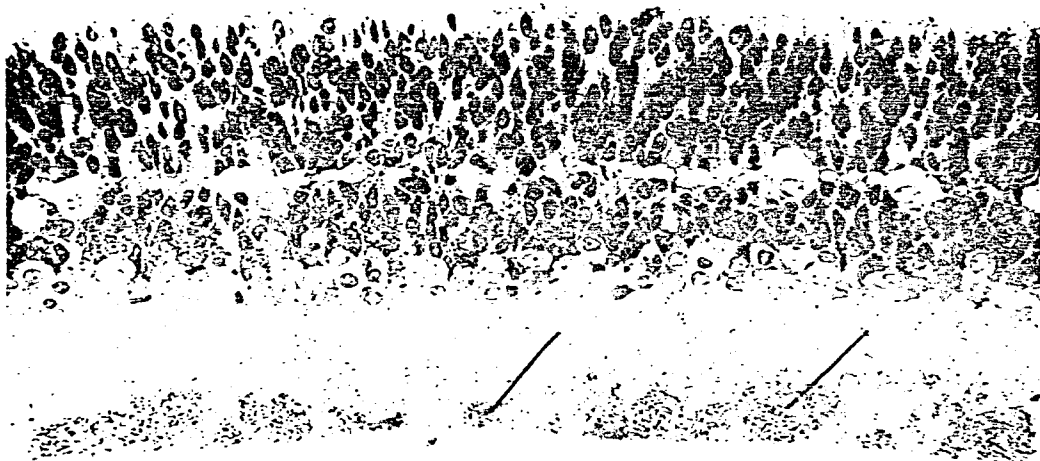


FIGURA 2

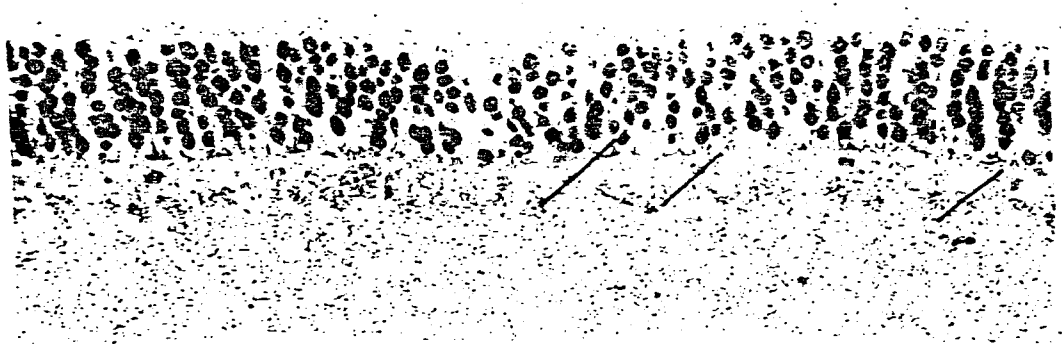


FIGURA 3

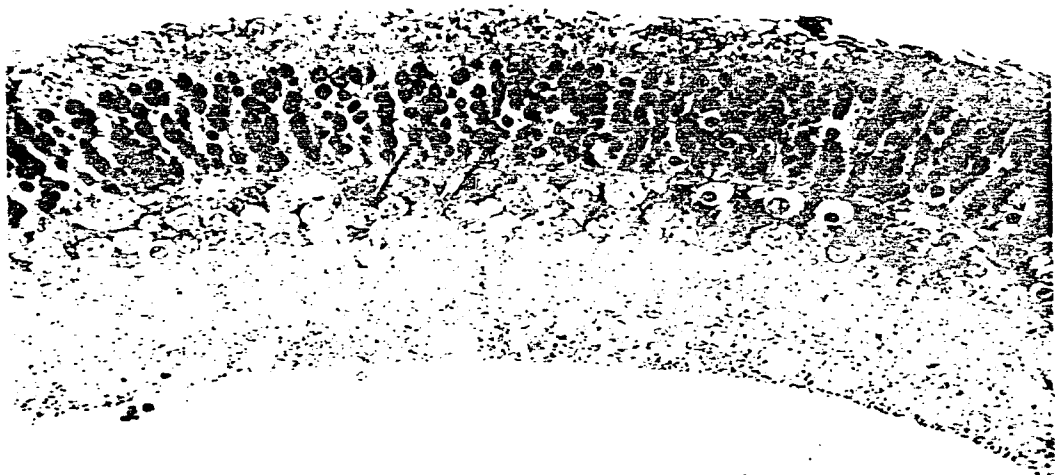


FIGURA 4

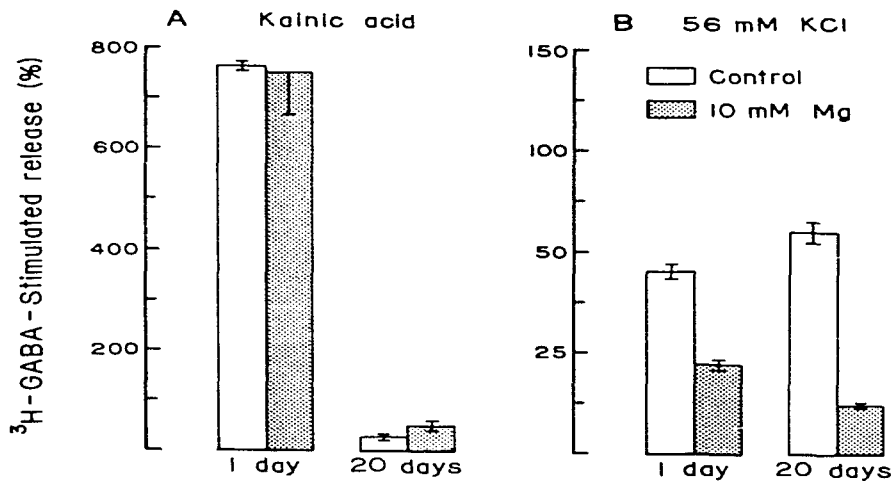


FIGURE 5

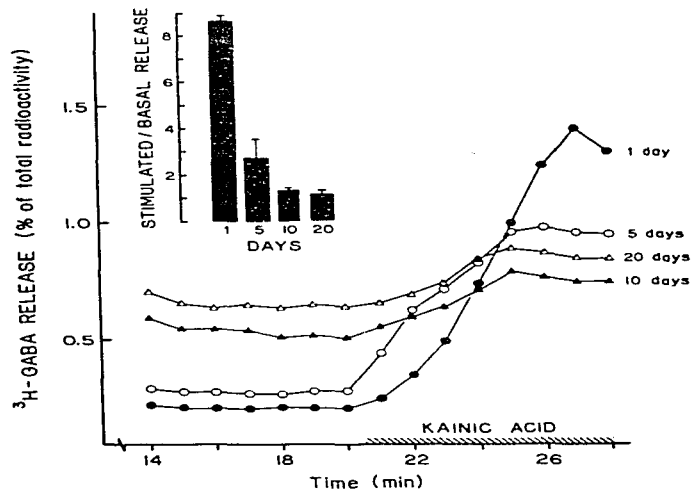


FIGURE 6

2.4.5. Efecto de los aminoácidos excitadores sobre la liberación de dopamina en retinas de pollo durante el desarrollo.

2.4.5.1. Introducción

Como se mencionó en secciones previas (ver secc. 1.4.4.3. y 4.5) existen suficientes evidencias que apoyan la posibilidad de que la dopamina funcione como transmisor de algunas células de la retina de los vertebrados, particularmente en las células amacrinas y, en algunas especies, también en las interneuronas.

Por otra parte, existe una serie de estudios relacionados con la ontogenia de las células dopaminérgicas en la retina; sin embargo todavía existen muchas dudas relacionadas con los parámetros funcionales de dichas células.

Los estudios sobre desarrollo en retinas de conejo (Fung et al., 1982; Lam et al., 1981; Osborne et al., 1984) coinciden con la idea de que existen neuronas específicas que están predeterminadas a ser dopaminérgicas y que algunos aspectos asociados con el desarrollo funcional de estas se manifiesta a diferentes tiempos.

En el pollo existe muy poca información sobre la ontogenia de las células dopaminérgicas. Kato y cols. (1980; 1984) estudiaron mediante histofluorescencia la distribución de neuronas monoaminérgicas en retinas de pollo a lo largo de los primeros días de desarrollo. Independientemente de este estudio no hay ningún otro sobre algún parámetro funcional a lo largo del desarrollo de las neuronas dopaminérgicas en la retina de pollo.

Existen, por otra parte, muchas evidencias que apoyan un

papel neurotransmisor para los aminoácidos excitadores en la retina de los vertebrados (ver secc. I.4.1.2. y I.4.3.2.). Sin embargo, existe poca información sobre la interacción entre las neuronas aminoacidérgicas y dopaminérgicas en la retina.

Teniendo como antecedente los resultados obtenidos en el trabajo presentado previamente (secc. II.2.3.2.), así como las diferencias observadas en las relaciones entre los aminoácidos excitadores y el GABA en la retina de conejo durante el desarrollo (secc. II.2.4.4.), decidimos estudiar en este trabajo el efecto del glutamato y de los agonistas de los aminoácidos excitadores, kainato y N-metil-D-aspartato (NMDA) sobre la liberación de dopamina-H3 en la retina de pollo durante el desarrollo embrionario, con la finalidad de conocer la interacción entre estos dos grupos de transmisores en la retina inmadura de pollo, particularmente los aspectos ontogénicos de la liberación de esta catecolamina por acción de los aminoácidos excitadores.

2.4.5.3. Metodología

La metodología empleada constituye básicamente la misma que la descrita en las secciones previas. Las retinas incubadas en presencia de dopamina-H3 se superfundieron con los distintos medios conteniendo los agentes despolarizantes después de haber obtenido una liberación basal constante. Todos los medios se suplementaron con pargilina ($10^{-7}M$) y ácido ascórbico (0.1 mg/ml) para inhibir la degradación enzimática y la oxidación de la dopamina.

2.4.5.3. Resultados

En un estudio previo (secc. II.2.3.2.) encontramos que los aminoácidos excitadores o sus análogos no ejercían acción alguna sobre la liberación de dopamina en retina de pollo adulto. En el embrión de pollo, sin embargo, estos compuestos son capaces de estimular la liberación de la dopamina en la retina. La Figura 1 muestra el efecto de 0.1 mM de ácido kainico y de 56 mM de KCl sobre la liberación de dopamina en retinas de embrión de pollo de diferentes días de incubación. El máximo efecto estimulante del kainato se detectó entre los días 12 y 16 de desarrollo embrionario, siendo en el día 14 cuando se obtuvo la mayor estimulación de la liberación.

Se estudio el efecto del KCl sobre la liberación de dopamina durante el desarrollo embrionario y se encontro que bajo estas condiciones la liberación de dopamina se incrementa progresivamente a partir del día 7 hasta alcanzar el máximo de estimulación después de la eclosión del pollo sin que esta se modifique posteriormente (Fig. 1).

Se estudio tambien el efecto del glutamato y del NMDA sobre la liberación de dopamina durante el desarrollo. La tabla I muestra que, al igual que el kainato, estos dos compuestos tienen un efecto estimulante sobre la liberación de dopamina. La máxima liberación se obtiene también a los 14 días del desarrollo del embrión. Notese, sin embargo, que el efecto estimulante de éstos compuestos es mucho menor que en el caso del ácido kainico.

En un intento por conocer de que manera se afectaba la

liberación de otros compuestos neuroactivos por acción del kainato durante el desarrollo, se estudió la liberación de GABA-H3 estimulada por kainato 0.1 mM a diferentes edades. La tabla II muestra que la liberación de GABA-H3 se comporta de una manera diferente a la de dopamina, incrementándose gradualmente a partir del día 7 de incubación, alcanzando el máximo de liberación en la retina madura.

TABLA I. Efecto del glutamato y NMDA (2 mM) sobre la liberación de dopamina-H3 en retinas de pollo de 7, 12 y 14 días de incubación.

Las retinas se preincubaron en presencia de dopamina-H3 y se perfundieron con un medio conteniendo los agentes excitadores en una concentración de 2 mM. Los resultados se expresan como el por ciento de la estimulación de la liberación \pm E.E. de al menos 3 experimentos.

| EDAD (días) | GLUTAMATO | NMDA |
|-------------|----------------|----------------|
| 7 | 0 | 0 |
| 12 | 21.5 \pm 3.4 | 16.1 \pm 2.1 |
| 14 | 36.5 \pm 2.8 | 45.8 \pm 4.4 |
| adulto | 0 | 0 |

TABLA II. Efecto del ácido kainico (0.1 mM) sobre la liberación de GABA-H3 en retinas de pollo durante el desarrollo. Los resultados se expresan como el porcentaje de estimulación de la liberación basal \pm E.E. del número de experimentos entre paréntesis.

| EDAD (días) | % LIBERACION DE GABA-H3 |
|-------------|-------------------------|
| 7 | 23.0 (2) |
| 11 | 123.6 \pm 45.6 (3) |
| 14 | 365.9 \pm 76.7 (3) |
| 16 | 498.3 (2) |
| 18 | 635.5 (2) |
| 21 | 1523.0 \pm 127 (3) |
| adulto | 2242.3 \pm 274 (3) |

2.4.5.4. Discusión

A partir de una serie de evidencias bioquímicas y electrofisiológicas se sabe que tanto la dopamina como los aminoácidos excitadores funcionan como neurotransmisores en la retina de los vertebrados. En un estudio previo (secc. II.2.3.2.) encontramos que en la retina madura de pollo no existen neuronas dopaminérgicas que reciba entradas sinápticas de neuronas aminoacidérgicas excitadoras, dado que ni el glutamato, kainato o NMDA afectan la liberación basal de esta catecolamina. Estos resultados coinciden con los obtenidos en retinas de otras especies de vertebrados (Ehinger, 1982,83).

Durante el desarrollo, sin embargo, tanto el kainato como el glutamato y el NMDA estimulan la liberación de dopamina. Sin embargo, este evento ocurre en un rango de tiempo relativamente corto con un efecto máximo en el día 14 de incubación (Fig. 1 y Tabla I). Esta acción ejercida por los aminoácidos excitadores parece ser específica ya que la liberación de dopamina inducida por concentraciones despolarizantes del KCl presenta un patrón de distribución temporal muy diferente (Fig. 1).

Cuando se estimula la liberación de GABA-H₃ con ácido kainico en la retina en desarrollo se encontró un patrón temporal diferente al de la liberación de dopamina, pero similar a la estimulación con KCl (Tabla II y Fig. 1). Estos resultados sugieren que existe un periodo en el desarrollo durante el cual las neuronas dopaminérgicas adquieren cierta sensibilidad a los aminoácidos excitadores que puede manifestarse en una liberación del transmisor y que dicha sensibilidad desaparece súbitamente sin que vuelva a manifestarse en el adulto. Además, dicho

cambio en la sensibilidad no es un fenómeno general de la retina sino específico para estas células dados los resultados obtenidos en la liberación del GABA.

Estos resultados pueden relacionarse con los estudios de Kato y cols. (1984), quienes estudiaron la distribución de las neuronas monoaminérgicas en la retina de pollo durante el desarrollo. Estos autores encontraron cinco tipos de células monoaminérgicas. Uno de estos tipos acumula dopamina exógena y aparece a los 10 días de incubación en la parte media de la capa nuclear interna. a los 12 días de incubación estas células se hacen más aparentes. De entre los 5 tipos celulares, estas neuronas son las únicas que migran. En el día 15 inician la migración y al final de la incubación (día 20) estas células se localizan en la parte más interna de la capa nuclear interna.

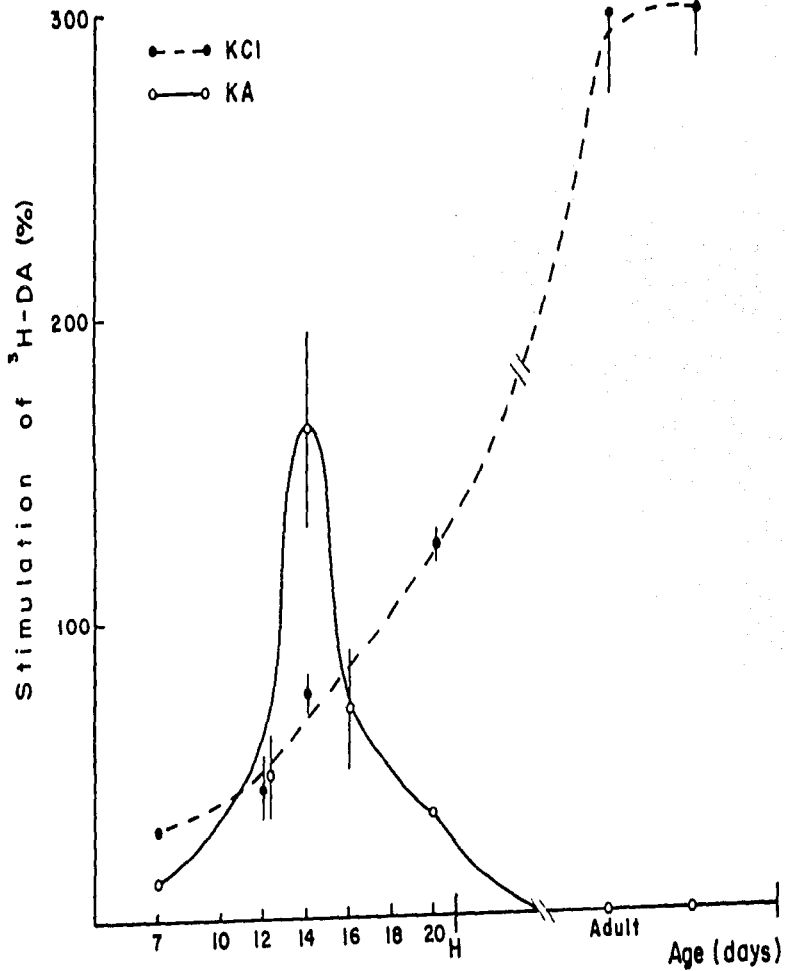
Es posible que dicho fenómeno de migración está asociado a la pérdida de sensibilidad a los aminoácidos excitadores de estas células dopaminérgicas o de otras de la misma naturaleza. Durante el proceso de la migración podrían perderse entradas sinápticas excitadoras y, en consecuencia, los receptores sinápticos para estos aminoácidos.

Otras posibilidades alternativas consistiría en que ciertas células fueran capaces de acumular y liberar dopamina durante un tiempo preciso en el desarrollo y posteriormente degenerar y morir como parte del proceso de maduración, como ya se ha demostrado en algunas regiones del SNC (Hume et al., 1983). Es posible, incluso, que estas células dopaminérgicas no mueran sino que únicamente cambien de transmisor como consecuencia de otras entradas sinápticas como ocurre en algunas preparaciones

del Sistema Nervioso Periferico (Chun y Patterson, 1977; Le Douarin et al., 1978; Patterson et al., 1976).

Pies de Figura

Figura 1. Efecto del acido kainico (0.1 mM) y KCl (56 mM) sobre la liberación de dopamina-H3 de retinas de pollo a diferentes tiempos en el desarrollo. Los resultados se expresan como el porcentaje de estimulación de la liberación basal de dopamina. Cada punto es el promedio de 3-6 experimentos \pm E.E.



III. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta serie de estudios pueden resumirse de la siguiente manera:

- 1) La presencia de agonistas y antagonistas sinápticos de neurotransmisores, así como condiciones que bloquean la transmisión sináptica de los fotorreceptores hacia las capas más internas de la retina, no modificaron la liberación de taurina estimulada por luz, salvo en el caso de algunos antagonistas de los aminoácidos excitadores. Estos datos sugieren que la poza de taurina liberable por luz se localiza en los fotorreceptores y que el papel fisiológico de dicha poza no está relacionado directamente con la neurotransmisión en la retina.
- 2) Los agonistas del receptor sináptico de los aminoácidos excitadores (glutamato, aspartato y kainato) estimularon la liberación de GABA- H^+ en retinas de rana y pollo. dicha liberación ocurrió de células horizontales. Por otra parte, en retinas de rata, estos compuestos no tuvieron ningún efecto sobre la liberación de GABA- H^+ . Esto sugiere que en mamíferos no existen contactos sinápticos directos entre neuronas que usan ambos transmisores, mientras que en aves y anfibios la única relación existente entre estos es entre fotorreceptores aminoacídúrgicos excitadores y neuronas horizontales GABAérgicas.
- 3) Ninguno de los agonistas del receptor de los aminoácidos excitadores (glutamato, kainato y NMDA) estimularon la liberación de dopamina- H^+ en retinas de pollo adulto, sugiriendo una ausencia de contactos sinápticos entre neuronas

aminoacidérgicas y dopaminérgicas en retina de ave. Estos datos coinciden con lo sugerido por otros autores en estudios previos en retinas de peces y mamíferos.

- 4) En la retina de pollo en desarrollo los agonistas del receptor de los aminoácidos excitadores (Glutamato, Glicinato y NMDA) inducen la liberación de dopamina-HP durante un periodo de tiempo en el desarrollo, con un máximo en el día 14 de incubación hasta desaparecer por completo inmediatamente después de la eclosión.
- 5) A diferencia de lo que ocurre en el adulto, la retina inmadura de conejo libera GABA-HP durante los primeros días del desarrollo por acción de los aminoácidos excitadores. Dicha liberación ocurre sólo de células horizontales, en similitud a lo ocurrido en retinas maduras de aves y anfibios. Esto sugiere un posible papel trófico del GABA durante el desarrollo de la retina.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

IV. CONCLUSIONES GENERALES

El estudio de los aspectos neuroquímicos de la retina presenta ciertas dificultades debido a la multiplicidad de subpoblaciones neuronales, así como a la diversidad en los circuitos neuronales entre las diferentes especies de vertebrados. Sin embargo, con el auxilio de múltiples disciplinas se ha llegado a tener una gran cantidad de información útil para el entendimiento de gran parte de la neuroquímica de la retina.

En el presente trabajo encontramos que entre los vertebrados existen diferencias en los circuitos de la retina que involucran a los aminoácidos neuroactivos. Así, en el pollo y rana parece ser que las interacciones de este tipo ocurren básicamente entre fotorreceptores aminoacidérgicos excitadores y neuronas horizontales GABAérgicas, mientras que en mamíferos parece no haber interacción directa entre neuronas que manejen ambos grupos de transmisores.

Por otra parte, en un intento por complementar el cuadro de interacciones de las neuronas aminoacidérgicas, encontramos que, al igual que en peces y mamíferos como ya se había demostrado, en el pollo no existen influencias directas entre neuronas que liberan aminoácidos excitadores y neuronas dopaminérgicas.

Los estudios en el desarrollo se llevaron a cabo con la finalidad de obtener mayor información sobre los circuitos antes mencionados. En estos estudios encontramos que las retinas inmaduras de mamíferos se comportan como las retinas maduras de pollo y de rana tanto en la distribución de GABA como en la respuesta ante la estimulación con los análogos de los

aminoácidos excitadores. Por otra parte, en la retina de pollo los aminoácidos excitadores tienen un claro efecto estimulante sobre la liberación de dopamina en la retina inmadura, efecto que desaparece después de la eclosión. Todos estos resultados sugieren que durante el desarrollo de la retina se llevan a cabo ciertos arreglos en la circuitería neuronal. Falta saber, sin embargo, cuáles son los mecanismos que rigen dichos cambios y cuál es el significado fisiológico de estos eventos. Es posible que las neuronas o compuestos involucrados, como el GABA, tengan una función adicional durante la sinaptogénesis. Estos compuestos podrían participar como factores mediadores en los procesos de maduración de este tejido.

Finalmente, nuestros resultados sobre la participación de la taurina en la retina sugieren fuertemente que este aminoácido neuroactivo tiene una función primordial relacionada con la actividad de los fotorreceptores y que el papel que podría desempeñar dentro de los circuitos neuronales de la retina como neurotransmisor sería muy limitado.

V. REFERENCIAS

- Ames A y Pollen DA (1969): Neurotransmission in central nervous tissue: A study of isolated rabbit retina. J. Neurophysiol. 32: 424-442.
- Ariel M y Dax NW (1981): Effects of cholinergic drugs on receptive field properties of rabbit retinal ganglion cells. J. Physiol. 324: 135-150.
- Bailey CH (1981): Visual system I: The retina. Ep: "Principles of Neural Sciences" (Kandel ER y Schwartz JH, eds.) Nueva York: Elsevier/North Holland. pp. 213-225.
- Bartoff A y Norton AL (1960): Simultaneous recording of photoreceptor potentials on the Hill component of ERG. Vision Res. 5: 527-533.
- Baughman RW y Bader LR (1977): Biochemical characterization and cellular localization of the cholinergic system in the chicken retina. Brain Res. 138: 469-480.
- Baughman WR, Bader LR y Schwartz EA (1978): Autoradiographic localization of cholinergic cells in retina. Neurosci. Lett. 2: 1102.
- Boycott BB, Dowling JE, Fisher SK, Kolb H y Lattes AM (1975): Interplexiform cells of the mammalian retina and their comparison with the catecholamine-containing retinal cells. Proc. R. Soc. Lond. B191: 353-368.
- Brandon C, Lam DMK, Su Y y Wu Jy (1980): Immunocytochemical localization of GABA neurons in the rabbit and frog retina. Brain Res. Bull. 5: 21-29.
- Brandon C, Lam DMK y Wu Jy (1979): The gamma-aminobutyric acid system in rabbit retina: Localization by immunocytochemistry and autoradiography. Brain Res. 168: 307-326.
- Brecha N, Barté HJ y Shenker C (1981): Neuropeptide-like and somatostatin-like immunoreactivity within amacrine cells of the retina. Neuroscience. 6: 1329-1340.
- Bruun A y Ehinger B (1972): Uptake of the putative neurotransmitter, glycine, into the rabbit retina. Invest. Ophthalmol. 11: 191-198.
- Bruun A y Ehinger B (1974): Uptake of certain possible neurotransmitters into retinal neurons of some mammals. Exp. Eye Res. 19: 433-437.
- Burt DR (1979): Thyrotropin releasing-hormone: Apparent receptor binding in retina. Exp. Eye Res. 29: 353-365.
- Cervetto L y MacNichol EP (1972): Inactivation of horizontal cells in turtle retina by glutamate and aspartate. Science. 178: 787-788.

- Cowan WM y Powell TPS (1963) Centrifugal fibers in the avian visual system. Proc. R. Soc. Lond. 158: 232-252.
- Coulombre AJ (1961): Cytology of the developing eye. Int. Rev. Cytol. 11: 151-194.
- Coyle JT Molliver ME. (1973): In vivo injection of kainic acid: A new method for selectively lesioning neuronal cell body while sparing axons of passage. J. Comp. Neurol. 130: 301-324.
- Curtis DR Luggan AW, Fearn J, Johnston GAR, McLennan H (1971) Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. Brain Res. 33: 57-70.
- Cunningham RA y Miller RF (1976): Taurine: its selective action on neuronal pathways in the rabbit retina. Brain Res. 117: 341-345.
- Cunningham RA y Miller RF (1980): An electrophysiological analysis of taurine and glycine action on neurons of the mudpuppy retina. II. ERG, FNR and Muller cell recording. Brain Res. 197: 139-151.
- Cunningham RA y Neal MJ (1983) Effect of aminobutyric acid agonists, glycine, taurine and neuropeptides on acetylcholine release from the rabbit retina. J. Physiol. 336: 665-677.
- Dawson G y Neal MJ (1984): Taurine uptake processes in the isolated rabbit retina and the effect of light. Brain Res. 30: 333-346.
- Del Castillo J y Katz D (1954): The effects of magnesium on the activity of motor nerve endings. J. Physiol. 124: 555-559.
- Dick E, Miller RF y Sahebani MM (1980): Opioids and substance P influence ganglion cells in amphibian retina. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 19: 102 (ARVO suppl.).
- Dolara P, Arezzetti A, Giotti A y Pasquini G (1973) Effect of taurine on calcium kinetic of guinea pig heart. Eur. J. Pharmacol. 29: 352-358.
- Dowling JE (1970): Organization of vertebrate retina. Invest. Ophthalmol. 9: 485-489.
- Dowling JE (1979): Information processing by local circuits: The vertebrate retina as a model system. Eni. The Neurosciences: Fourth Study Program (Smith PD y Worden SA, eds.) Cambridge, Mass: MIT Press, pp 143-181.
- Dowling JE y Boycott BB (1966): Organization of the primate retina: Electron microscopy. Proc. R. Soc. Lond. 115: 80-111.
- Dowling JE y Ehinger B (1975): Synaptic organization of the amine-containing interplexiform cells of the goldfish and Cebus monkeys retinas. Science. 189: 270-273.
- Dowling JE y Ehinger B (1978a): The interplexiform cell system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. Proc.

R. Soc. Lond., B207: 7-26.

- Dowling JE y Ehinger B (1978b): Synaptic organization of the dopaminergic neurons in the rabbit retina. J. Comp. Neurol., 180: 203-220.
- Dowling JE, Ehinger B y Hedden W (1978): The interplexiform cell: A new type of retinal neuron. Invest. Ophthalmol. 15: 916-926.
- Dowling JE y Ripps H (1972): Adaptation in skate photoreceptors. J. Gen. Physiol. 60: 698-712.
- Ehinger B (1976): Biogenic monoamines as transmitters in the retina. En: Transmitters in the Visual Process (Bonting SL, ed.) Nueva York: Pergamon Press, pp 145-164.
- Ehinger B (1982): Neurotransmitter system in the retina. Retina, 2: 305-321.
- Ehinger B (1983): Functional role of dopamine in the retina. En: Progress in Ret. Res. (H N Osborne y G Thader, eds.) Oxford: Pergamon Press, pp 215-232 Vol. 2.
- Ehinger B y Falck B (1971): Autoradiography of some suspected neurotransmitter substance: GABA, glycine, glutamic acid, histamine, dopamine, and L-tyros. Brain Res. 32: 167-172.
- Ehinger B, Falck B y Lattes AM (1969): Adrenergic neurons in teleost retina. Z. Zellforsch. 87: 285-297.
- Erich D y Morgan IG (1980): Amino acid destroys displaced amacrine cells in post-natal chicken retina. Neuroscience Lett. 17: 43-48.
- Farber D. y Brown BM (1978): Cyclic GMP: proposed role in visual cell function. Visual Res. 18: 427-432.
- Florén I y Hansson HC (1980): Investigation into whether 5-hydroxytryptamine is a neurotransmitter in the retina of the rabbit and chicken. Invest. Ophthalmol. 19: 117-125.
- Fung SC, Hong YC y Lam DMK (1982): Prenatal development of GABAergic, glycinergic and dopaminergic neurons in the rabbit retina. J. Neuroscience 2: 1623-1632.
- Frederick JM, Rayborn ME, Lattes AM, Lam DMK y Hollyfield JG (1982): Dopaminergic neurons in the human retina. J. Comp. Neurol. 210: 65-79.
- Gallego A (1982): Organization of the outer plexiform layer of the tetrapods retina: horizontal cells of mammalian and avian retina. En: The Structure of the eye (Hollyfield J.G., ed.) New York: Elsevier North Holland, pp. 151-164.
- Gerstenfeld HM y Piccolino M (1977): Muscarinic antagonists block

- come to horizontal cell transmission in turtle retina. Nature, 268: 257-259.
- Gerschenfeld HM y Piccolino M (1979): Pharmacology of the connections of cones and L-horizontal cells in the vertebrate retina. En: "The Neurosciences Fourth Study Program" (Schmitt PG y Worden PG, eds.) Cambridge, Mass: MIT Press, pp 213-226.
- Glickman RP, Adolph AR y Dowling JE (1982): Inner plexiform circuits in the carp retina: effects of cholinergic agonists, GABA, and substance P on the ganglion cells. Brain Res., 234: 81-99.
- Goodchild M y Neal MJ (1973): The uptake of 3H-gamma-aminobutyric acid by the retina. Brit. J. Pharmacol., 47: 549-562.
- Graham LI, Baxter CF y Lolley RN (1970): In vivo influence of light or dark eye on the GABA system in the retina of the frog (*Xenopus laevis*). Brain Res., 20: 279-284.
- Graham LT y Pong SP (1972): Evidence for a function of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the neural mechanism of light adaptation in the rat retina. Jour. Gen. Physiol., 5: 82.
- Hagins WA y Yoshikami S (1974): A role for Ca^{2+} in excitation of retinal rods and cones. Exp. Eye Res., 18: 299-305.
- Hampton CP, Garcia C y Redburn PA (1981): Localization of acidic acid-sensitive cells in mammalian retina. J. Neurocytol., 10: 89-111.
- Hayes MC, Carey RF y Schmidt AV (1975) Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. Science, 190: 997-991.
- Hayes BP (1977): Intracellular gap junctions in the developing retina and pigment epithelium of the chick. Exp. Embryol., 151: 325-335.
- Hayes BP (1986): The structural organization of the pigeon retina. En: "Progress in Retinal Research" (N Osborne y G.J. Chader, eds.) Oxford: Pergamon Press, pp. 197-225 Vol. 1.
- Hedden WJ y Dowling JE (1973): The interplexiform cell system. II. Effects of dopamine on goldfish retinal neurons. Proc. R. Soc. Lond., B201: 27-36.
- Hendrickson A, Flores I, Patterson R, Brecha NC y Hunt SP (1981): Neurotransmitter localization in the Macaca monkey retina. Invest. Ophthalm. Vis. Sci., 20: 237.
- Hockel SHJ y Muller WE (1982): L-glutamate receptor binding in bovine retina. Exp. Eye Res., 35: 55-60.
- Hoffman AF y Small DM (1967): Detergent properties of bile salts: correlation with physiological function. Ann. Rev. Med., 18: 333-341.
- Hollyfield JG, Rayborn ME, Sarthy PV y Lan DMK (1980) Retinal

- development: Time and order of appearance of specific neural properties. Neurochem. Int. 93-101.
- Hubel DH y Wiesel TN (1960): Receptive fields of optic nerve fibers in the spider monkey. J. Physiol. 154: 572-590.
- Hughes W.F. y LaVelle A (1974): On the synaptogenic sequences in the chick retina. Anat. Rec. 190: 423-438.
- Ikeda H y Sheardown MJ (1981): Aspartate may be an excitatory transmitter mediating visual excitation of "sustained" cells in the cat retina- iontophoretic studies in vivo. J. Physiol. 319- 77F.
- Ikeda H y Sheardown MJ (1982a): Aspartate may be an excitatory transmitter mediating visual excitation of "transient" but not "transient" cells in cat retina: iontophoretic studies in vivo. Neuroscience, 7: 25-36.
- Ikeda H y Sheardown MJ: Acetylcholine may be an excitatory transmitter mediating visual excitation of "transient" cells with periphery effect in the cat retina: iontophoretic studies in vivo. Neuroscience, 7: 1299-1308.
- Ikeda H y Sheardown MJ: GABA may mediate inhibition of on-centre, and glycine that of off-centre retinal ganglion cells in the cat. J. Physiol. 328: 34-35F.
- Jacobsen JG y Smith LH (1968): Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. Physiol. Rev. 48: 424-511.
- Kahn AJ (1974): An autoradiographic analysis at the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. Dev. Biol. 38: 30-36.
- Kaneko A y Shimazaki H (1976): Synaptic transmission from receptor to bipolar and horizontal cells in the carp retina. Enj. "Neural Principles of Vision" (LeVitt R, F. y Weiler R, eds.) Berlin y Heidelberg: Springer-Verlag, pp 143-157.
- Kato S, Nakamura T y Negishi E (1980): Postnatal development of dopaminergic cells in the rat retina. J. Comp. Neurol 191: 227-236.
- Kato S, Negishi E y Terahashi T (1984): Embryonic development of monoaminergic neurons in the chick retina. J. Comp. Neurol. 224: 437-444.
- Kennedy AJ y Voaden MJ (1974): Distribution of free amino acids in the frog retina. Biochem. Soc. Trans. 2: 1256-1258.
- Kennedy AJ y Voaden MJ (1976): Studies on taurine uptake and release of radioactive taurine by the frog retina. J. Neurochem. 27: 131-137.
- Kim JS, Hassler R, Hang P y Paik KS (1977): Effect of frontal

- ablation on striatal glutamic acid levels in rat. Brain Res., 132: 370-374.
- Kolb H (1979): The inner plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. J. Neurocytol., 8: 295-329.
- Kolb H y Famiglietti E V (1974): Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. Science 184: 47-49.
- Kolb H y West R W (1977): Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. J. Neurocytol., 6: 155-170.
- Kong YC, Fung SC y Lam DMK (1980): Postnatal development of glycinergic neurons in the rabbit retina. J. Comp. Neurol. 193: 1127-1135.
- Krnjevic K y Phillips J W (1963): Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. J. Physiology (London), 109: 274-304.
- Kulakowski EC y Mataro J (1984): Hypoglycemic properties of taurine: not mediated through enhanced insulin release. Biochem. Pharmacol. 33: 2835-2838.
- Lake N Marshall J y Voaden R H (1978): High affinity uptake sites for taurine in the retina. Exp. Eye Res. 27: 713-718.
- Lam DMK (1975): Synaptic chemistry of identified cells in the vertebrate retina. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 40: 571-579.
- Lam DMK y Hollyfield JG (1980): Localization of putative amino acid neurotransmitters in the human retina. Exp. Eye Res. 31: 729-732.
- Lam DMK, Lacater EM y Naka EI (1978): Gamma-aminobutyric acid: a neurotransmitter candidate for cone horizontal cells in the catfish retina. Comp. Neurol. Acad. Sci. USA. 75: 6610-6613.
- Lam DMK, Su Y Y T, Chin C A, Brandon C W, Yu H and RE y Lacater EM (1980a) GABAergic horizontal cells in the teleost retina. Brain Res. in press.
- Lam DMK, Fung SC y Kong YC (1981): Postnatal development of dopaminergic neurons in the rabbit retina. J. Neurocytol. 1: 1117-1132.
- Lam DMK, Fung SC y Kong YC (1980b): Postnatal development of GABAergic neurons in the rabbit retina. J. Comp. Neurol. 193: 89-102.
- Lam DMK, Su Y Y T, Swaini Marc RE Brandon C y Wu JY (1979): Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in

- the goldfish retina. Nature. 278: 565-567.
- Lipton JM y Tickner CG (1979): Central effect of taurine and its analogues on fever caused by intravenous leucocytic Pyrogen in the rabbit. J. Physiol. 337: 539-543.
- López-Colomé AM (1981): High affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. Neurochem. Res. 6: 1019-1033.
- López-Colomé AM, Saiceda R, Pasantes-Moraes H (1979): Potassium stimulated release of GABA glycine and taurine from the chick retina. Neurochem. Res. 4: 441-444.
- López-Colomé AM y Somohano F (1982): Characterization of L-3H-aspartate binding to chick retinal subcellular fractions. Vis. Res. 22: 1485-1501.
- López Colomé AM y Somohano F (1984): Localization of L-glutamate and L-aspartate synaptic receptors in chick retinal neurons. Brain Res. 298: 157-162.
- López-Colomé AM y Somohano F (1986): Effect of selective kainate lesions on the release of glutamate and aspartate from chick retina. J. Neurochem. Res. 15: 203-210.
- Maddes F y Redburn IAR (1982): GABA binding in developing rabbit retina. Neurochem. Res. 7: 490-503.
- Mandel P, Pasantes-Moraes H, Urban PF (1978): Taurine, a putative transmitter in the retina. Eng. Transmitters in the Visual Process (Bonting SL, ed.) Oxford, New York: Pergamon Press, pp 89-109.
- Marc RE Lam DMH (1981a): Uptake of aspartic acid and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina. Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 7188-7189.
- Marc RE y Lam DMH (1981b): Glycinergic pathways in the goldfish retina. J. Neurosci. 1: 152-165.
- Marc RE Stell WF, Bok J, Lam DMH (1978): GABAergic pathways in the goldfish retina. J. Comp. Neurol. 182: 231-246.
- Mariani AP (1982): Biplexiform cells: Ganglion cells of the primate retina that contact photoreceptors. Science. 216: 1134-1136.
- Masland RH y Ames A (1976): If Responses to acetylcholine of ganglion cells in the isolated mammalian retina. J. Cell. Biol. 33: 159-178.
- Masland RH y Mills JW (1979): Autoradiographic identification of acetylcholine in the rabbit retina. J. Cell. Biol. 33: 159-178.
- Mazzeo S Neal NJ (1978): Dependence of potassium stimulated

release of PH-acetylcholine from the retina on high affinity choline uptake. Br. J. Pharmacol., 62: 436-439.

McLaughlin BJ (1976): A fine structural and E-PTA study of photoreceptor synaptogenesis in the chick retina. J. Comp. Neurol. 170: 347-364.

Meller K (1984): Morphological studies on the dev. of the retina. En: Progress in Retinal Research: (NN Osborne y G Chader, eds.) Oxford: Pergamon Press, pp 1-19 Vol. 3.

Meller K y Tetzlaff W (1976): Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. Cell Tiss. Res. 170: 145-159.

Miles RA (1972): Centrifugal control of the avian retina. Receptive field properties of retinal ganglion cells. Brain Res. 48: 69-94.

Miller RF (1979): The neuronal bases of ganglion cells receptor- field organization and the physiology of amacrine cells. Neuroscience Program, pp 227-245.

Missotten L (1968): The ultrastructure of retina. Bruselas Arsacia Uitgaven.

Mitchell DL y Redburn DA (1982): L- amino-4-phosphonobutyric acid and N-methyl-D-aspartate differentiate between PH-aspartate binding sites in bovine retina. Neurosci. Lett. 28: 241-246.

Morgan IG y Mundy PG (1982): Ganglion cells of chicken retina possess nicotinic rather than muscarinic acetylcholine receptors. Neurochem. Res. 7: 267-274.

Morgan IG (1983): Amino acid as a tool in Retinal Research En: Progress in Retinal Research (NN Osborne y G Chader, eds.) Oxford: Pergamon Press, pp 249-256 vol. 2.

Morgan IG y Kamp CW (1980) A GABAergic influence on the light-induced increase in dopamine turnover in the dark adapted rat retina in vivo. J. Neurochem. 34: 1082-1086.

Mosinger JL y Altschuler RA (1982): Immunocytochemical localization of aspartate amino transferase-like immunoreactivity in the guinea pig and cynomolgus retinas. Neurochem. Res. 7: 247.

Murakami M, Ohtsu I, y Ohtsuka T (1972): Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina. J. Physiol. 227: 899-913.

Naka EI (1977): Functional organization of catfish retina. J. Neurophysiol. 40: 26-42.

Nakamura Y, Mc Guire BA y Sterling P (1980): Interplexiform cells

- in cat retina" Identification by uptake of gamma-³H-aminobutyric acid and serial reconstruction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 658-661.
- Neal MJ (1976): Amino acid transmitter substances in the vertebrate retina. Gen. Pharmacol. 7: 321-332.
- Neal MJ Collins GG y Massey SC (1979): Inhibition of aspartate release from the retina of anaesthetised rabbits by stimulation with light flashes. Neurosci. Lett. 14: 241-245.
- Neal MJ (1983): Cholinergic mechanisms in the vertebrate retina. En: Progress in Retinal Research (NN Osborne y G. Chader, eds.) Oxford Pergamon Press, pp. 191-212 vol. 3.
- Nelson R (1973): A comparison of electrical properties of neurons in Neonatal retina. J. Neurophysiol. 36: 317-336.
- Nichols DW y Koelle GR (1964): Comparison of the localization of acetylcholinesterase and non-specific cholinesterase activities in mammalian and avian retinas. J. Comp. Neurol. 131: 1-16.
- Norton AL, Spekreijse H, Warner HG y Volzandt ML (1970): Responses to directional stimuli in retinal presynaptic units. J. Neurosci. 26: 92-107.
- Osborne NN, Patel S y Vigny A (1984): Dopaminergic neurons in various retinas and the postnatal development of the tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the rabbit retina. Histochemistry. 80: 309-323.
- Osborne NN Patel S, Beaton LW y Neuhoff V (1986): GABA neurones in retinae of different species and their postnatal development in situ and in culture in the rabbit retina. Cell and Tiss. Res. 243: 111-123.
- Osborne NN (1981): Noradrenaline, a transmitter candidate in the retina. J. Neurochem. 36: 17-27.
- Orr HT, Cohen AL y Lowry OH (1976): The distribution of taurine in the vertebrate retina. J. Neurochem. 26: 609-611.
- Pasantes-Morales H (1986): Current concepts on the role of taurine in the retina. En: Progress in Retinal Research (NN Osborne y G Chader, eds.) Oxford, Pergamon Press, pp 207-229, vol.5.
- Pasantes-Morales H., Klithi J., Urban PF y Mandel P (1972): The physiological role of taurine in retina: Uptake and effect on electroretinogram. Physiol. Chem. Physiol. 4: 339-348.
- Pasantes-Morales H., Urban PF, Klithi J y Mandel P (1973): Light-stimulated release of 3SS-taurine from chick retina. Brain Res. 5: 375-378.

- Pasantes-Morales H, Guesada O y Carabez A (1981): Light-stimulated release of taurine from retinas of kainic acid-treated chicks. J. Neurochem., 36: 1583-1586.
- Pasantes-Morales H, Salceda R y López-Colomé AM (1976): The role of taurine in retina: Factors affecting its release. En: "Taurine" (Huxtable R y Barbeau A, eds.) Nueva York: Raven Press, pp 191-200.
- Pasantes-Morales H, Arzate ME y Cruz C (1982): The role of taurine in nervous tissues: its effects on ionic fluxes. Adv. Exp. Med. Biol., 9: 273-292.
- Pearson R (1972) The avian brain. Academic Press, Inc. (London) pp 279-318.
- Piccolino M (1981): Horizontal cells: historical controversies and new interest. En: "Progress in Retinal Research" (Osborne N y Chader G, eds.) Oxford: Pergamon Press, pp 147-162 vol. 5.
- Piccolino M y Gerschenfeld HM (1977): Lateral interactions in the outer plexiform layer in the turtle retina after atropine block of horizontal cells. Nature, 266: 259-261.
- Pourcho RG (1979): Localization of cholinergic synthesis in mammalian retina with peroxidase-conjugated alpha-bungarotoxin. Vision Res., 19: 287-292.
- Pourcho RG (1981): Autoradiographic localization of ³H-muscimol in the cat retina. Brain Res., 218: 187-189.
- Roger G y Roger D (1986): Generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken. Exp. Brain Res., 65: 481-488.
- Ramon y Cajal S (1911): The structure of the retina. (Thorpe SA y Glickstein M, traductores) Springfield, Illinois Thomas (1972).
- Raviola E y Raviola G (1982): Structure of the synaptic membranes in ten inner plexiform layer of the retina: A freeze-fracture study in monkeys and rabbits. J. Comp. Neurol., 209: 230-248.
- Redburn DA (1981): GABA and glutamate as neurotransmitters in rabbit retina. En: "Glutamate as a Neurotransmitter" (Uchiyama G y Gessa G, eds.) Nueva York: Raven Press, pp 79-89.
- Redburn DAR Modias P. (1986): Postnatal development of ³H-GABA-accumulating cells in the rabbit retina. J. Comp. Neurol., 243: 41-57.
- Redburn DA y Mitchell G. (1981): ³H-Muscimol binding in synaptosomal fractions from bovine and developing rabbit retinas. J. Neurosci. Res., 5: 487-495.
- Roberts PJ (1981): Binding studies for the investigation of receptors for L-glutamate and other excitatory amino acids. En: "Glutamate: Transmitter in the Central Nervous System" (Roberts PJ,

- Storm-Mathisen J y Johnston GAR, eds.). Nueva York: John Wiley and Sons Ltd., pp 35-53.
- Ross CD, Cohen AI y McDougal DB (1975): Choline acetyltransferase and acetylcholine esterase activities in normal and biologically fractional mouse retinas. *Invest. Ophthalmol.* 14: 756-761.
- Schacher SM, Holtzman E y Hood DC (1974): Uptake of horseradish peroxidase by frog photoreceptor synapses in the dark and the light. *Nature*. 249: 261-263.
- Schaeffer JM (1980): 3H-Muscimol binding in the rat retina. *Life Sci.* 27: 1193-1204.
- Schmidt G (1978) Taurine, fluxes in isolated cat and rat retina: effect of illumination. *Exp. Eye Res* 26: 527-537.
- Schitzer J y Ruseff AC (1984): Horizontal cells of the mouse retina contain glutamic acid decarboxylase like immunoreactivity during early developmental stages. *J. Neurosci.* 4: 2948-2955.
- Schwartz EA (1982): Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina. *J. Physiol.* 323: 211-227.
- Shiells G, Falck J y Nagashima S (1981): Action of glutamate and aspartate analogues on rod horizontal and bipolar cells. *Nature* 294: 592-594.
- Sidman RL (1961): Histochemistry of mouse retina studied with thymidine-³H. In: The structure of the eye (G.L. Snider, ed.) New York: Acad. Press pp 437-506.
- Slaughter MN y Miller RF (1981): L-Amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Visions*. 11: 182-185.
- Starr MS (1978): Uptake of taurine by retinas of different species. *Brain Res.* 151: 604-608.
- Stell WK (1965): Correlation of retinal cytoarchitecture and ultrastructure in goldfish preparations. *Anat. Rec.* 153: 389-397.
- Stell WK (1967): The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina. *Am. J. of Anat.* 136: 401-424.
- Stell WK, Marshall F, Yamada T, Brecha N y Karten H (1980) Peptides are in the eye of the beholder. *Trends Neurosci.* 3: 292-295.
- Straschill M (1948): Action of drugs on single neurons in the cat retina. *Vision Res.* 8:35-47.
- Sugiyama H, Daniels MP y Nirenberg M (1977): Muscarinic acetylcholine receptors of the developing retina. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74: 5524-5528.

- Thomas NT y Redburn IA (1978): Uptake of 14 -Aspartic and 14 -C-Glutamic acid by retinal synaptosomal fractions. J. Neurochem. 31: 63-68.
- Tomita T (1970): Electrical activity of vertebrate photoreceptors. Quart. Rev. Biophys. 3: 179-222.
- Toyoda J Hashimoto H y Ohtsuka N (1973): Bipolar amacrine transmission in the carp retina. Vision Res. 13: 295-307.
- Trifonov YA (1968): Study of synaptic transmission between the photoreceptor and the horizontal cell using electrical stimulation of the retina. Soviet J. Physiol. 14: 802-817.
- Van Gelder NR (1978): Glutamic acid and epilepsy, the action of taurine. Epil. Taurine and Neurochemical Disorders (A Barbeau y RJ Huxtable, eds.) New York: Raven Press.
- Vaughn JE Fambalietti EV y Baber RP (1981): GABAergic amacrine cells in rat retina: immunocytochemical identification and synaptic connectivity. J. Comp. Neurol. 197: 113-127.
- Vislie T (1983) Cell volume regulation in fish heart ventricles with special reference to taurine. Comp. Biochem. Physiol. 76: 307-314.
- Vivas IM y Inoué EI (1980): Certain aspects of acetylcholine metabolism in teleost retina. Neurochem. Res. 5: 317-323.
- Voaden MJ, Braeden AH, Marshall J y Lake N (1981): Taurine in the retina. Epil. The effects of taurine in excitable tissues (SI Baskin y SE Shaffer, eds.) New York: Spectrum Press, pp 145-150.
- Voaden MJ, Lake N, Marshall J y Donnan R (1977): Studies on the distribution of taurine and other neuroactive amino acids in the retina. Exp. Eye Res. 27: 243-257.
- Voaden MJ, Marshall J y Murray N (1974): The uptake of 3 H-gamma-aminobutyric acid and 3 H-glycine by the isolated retina of the frog. Brain Res. 67: 115-121.
- Vogel E, Maloney GS, Ling A y Daniels MP (1977): Identification of synaptic acetylcholine receptor sites in the retina with peroxidase-labeled alpha-bungarotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 1671-1675.
- Vorkel W y Hanibussch A (1971): Effect of strychnine on the electrophonogram of the isolated rabbit retina. Experientia (Basel). 27: 295-297.
- Watkins JC, Davies J, Evans RH, Francis AA y Jones AW (1981): Pharmacology of receptors for excitatory amino acids. Epil. "Glutamate as a Neurotransmitter. Advances in Biochemical Psychopharm." (Di Chiara G y Gessa GL, eds.) Nueva York: Raven Press, pp 263-273.
- Welch U y Storch U (1973): Estudio comparado de la citología e histología animal. Bilbao: Urno, SA de Ediciones, pp 193-203.

- Werblin FS (1970): Response of retinal cells to moving spots: Intracellular recording in Necturus maculosus. J. Neurophysiol., 33: 342-351.
- Werblin FS (1979): Integrative pathways in local circuits between slow-potentials cells in the retina. Enj. "The Neurosciences Fourth Study Program" (eds.: Schwartz PD y Worden F.) Cambridge, Mass: MIT Press, pp 193-211.
- Werblin FS y Dowling JE (1969): Organization of the retina of the mudpuppy, Necturus maculosus, II. Intracellular recording. J. Neurophysiol., 32: 337-350.
- White RD y Hearl HJ (1976): The uptake of L-glutamate by the retina. Brain Res., 111: 79-82.
- Wu SM y Dowling JE (1976): L-Aspartate: evidence for a role in cone photoreceptor synaptic transmission in the carp retina. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 4415-4417.
- Wyatt HJ y Law NW (1976): Special effects of neurotransmitter antagonists on ganglion cells in rabbit retina. Science 191: 204-205.
- Yazulla S (1986) GABAergic mechanisms in the retina. Enj. Progress in Retinal Research (NN Osborne y G. Chader, eds.) Oxford, Pergamon Press, pp 1-52 Vol. 5.
- Yazulla S y Brocha N (1980): Binding of the GABA analogue, ³H-muscimol, in the retinas of goldfish and chicken. Invest. Ophthalm. Vis. Sci., 19: 1143-1145.
- Yazulla S y Kleinschmidt J (1980): The effects of introcular injection of folic acid on the synaptic organization of the goldfish retina. Brain Res., 182: 287-291.
- Yazulla S y Kleinschmidt J (1981): Carrier-mediated release of GABA from retinal horizontal cells. Brain Res., 215: 119.
- Yazulla S y Schmidt J (1975): Radioautographic localization of ³H- α -bungarotoxin binding sites in the retinas of the goldfish and turtle. Vision Res., 15: 879-886.
- Yazulla S y Schmidt J (1977): Two types of receptor for α -bungarotoxin in the synaptic layers of the pigeon retina. Brain Res., 108: 45-57.
- Yoshikami S y Hagins WA (1973): Control of the dark current in vertebrate rods and cones. Enj. "Biochemistry and Physiology of Visual Pigments" (Langer n, ed.) Nueva York: Spring Verlag, pp 245-255.
- Young RW (1989): The organization of vertebrate photoreceptor cells. Enj. The Retina Morphology Function and Clinical Characteristics. Univ. of California Press, pp 177-210.