

03087
11 2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

**DIFERENCIACION DE LOS RECEPTORES PARA AMINOACIDOS
EXCITADORES EN LA RETINA**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA (NEUROCIENCIAS)

PRESENTA LA BIOL. FRIDA SOMOHANO ERES

MEXICO, D.F.

1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	pag.
<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>RESUMEN</u>	4
<u>ABSTRACT</u>	7
<u>INTRODUCCION</u>	9
I. CLASIFICACION DE LOS RECEPTORES PARA AAE	10
1. RECEPTORES TIPO NMDA	11
2. RECEPTORES TIPO NO-NMDA	21
II. LA RETINA COMO MODELO	23
III. EMBRIOGENESIS DE LA RETINA DE POLLO	27
1. ESTUDIOS HISTOLOGICOS	27
2. ESTUDIOS <u>IN VITRO</u>	31
IV. RECEPTORES PARA AAE EN LA RETINA DE ANIMALES ADULTOS	32
1. RECEPTORES SINAPTICOS	33
2. RECEPTORES PRESINAPTICOS	37
3. CAPTACION	41
V. ONTOGENIA DE LOS RECEPTORES PARA AAE	43
1. ESTUDIOS EN EMBRIONES	43
A. RECEPTORES PARA AAE EN EL SNC DE EMBRIONES	43
B. RECEPTORES PARA AAE EN LA RETINA EMBRIONARIA	45
2. ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES	46
A. RECEPTORES PARA AAE EN CULTIVOS DE CELULAS DEL SNC	46
B. RECEPTORES PARA AAE EN CULTIVOS DE CELULAS DE LA RETINA	47
<u>OBJETIVOS</u>	49
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	51
EMBRIONES	51
CULTIVOS	51
INMUNOCITOQUIMICA	53
MEDICION DE RECEPTORES POSTSINAPTICOS PARA AAE	55
CARACTERIZACION DE RECEPTORES PRESINAPTICOS PARA AAE	57
CARACTERIZACION DE LA CAPTACION DE AAE	57

	pag.
<u>RESULTADOS</u>	59
I. RECEPTORES SINAPTICOS	60
1. DIFERENCIACION <u>IN VIVO</u>	60
2. DIFERENCIACION <u>IN VITRO</u>	72
II. RECEPTORES PRESINAPTICOS (AUTORRECEPTORES)	83
III. CAPTACION	90
<u>DISCUSION GENERAL</u>	115
I. CORRELACION ENTRE LOS ESTUDIOS <u>IN VIVO</u> E <u>IN VITRO</u>	115
II. RECEPTORES PARA AAE EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DE	116
III. RECEPTORES PARA AAE EN ETAPAS INTERMEDIAS DEL DE	117
IV. RECEPTORES PARA AAE EN ETAPAS TARDIAS DEL DE	118
V. RECEPTORES PARA AAE EN LA ETAPA FINAL DEL DE	119
VI. "MODELO" DE LA EVOLUCION ONTOGENETICA DE LOS RECEPTORES PARA AAE	120
<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	126
<u>REFERENCIAS</u>	128

ABREVIATURAS:

AAE	aminoácidos excitadores
ACBC	ac. 1-amino ciclobutano-1-carboxílico
ACC	ac. 1-amino ciclopropano-1-carboxílico
ACPD	trans-1-amino-ciclopentil-1,3-dicarboxilato
AMPA	ac. α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AMPc	adenosin 3:5' monofosfato cíclico
AOH	DL-Asp- β -hidroxamato
APB	ac. 2-amino-4-fosfonobutírico
APH	ac. 2-amino-7-fosfonoheptanoico
APV	ac. 2-amino-5-fosfonovalérico
Asp	ac. aspártico
β -ODAP	ac. β -N-oxalyl-L- α , β -diamino propiónico
CCG	capa de células ganglionares
CGS 19755	ac. cis-4-(fosfonometil)-2-piperidin carboxílico
7-Cl KYNA	7-cloro-quinurenato
CMF-Hanks	BSS Solución salina de Hanks libre de Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺
CNE	capa nuclear externa
CNI	capa nuclear interna
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona
CPE	capa plexiforme externa
CPI	capa plexiforme interna
CPP	ac. 3(2-carboxipiperazin-4-yl)propil-1-fosfónico
DE	desarrollo embrionario
DG	diacil glicerol
DGL	diglicérido lipasa
DIV	días <u>in vitro</u>

FCS	suero de bovino fetal
FITC	isotiocianato de fluoresceína
γ-GG	γ-glutamil glicina
GABA	ac. γ-amino butírico
GAMS	γ-D-glutamil aminometil sulfonato
GDEE	dietil éster del ac. glutámico
GFAP	proteína acídica fibrilar de la glía
Glu	ac. glutámico
Gli	glicina
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GOH	Monohidroxamato del ac. glutámico
HA-966	1-hidroxi-3-aminopirrolidona-2
HETE's	ácidos hidroxieicosatetraenoicos
HOMOCYS	ac. homocistéico
7-HPCA	ac. (RS)-3-hidroxi-4,5,6,7-tetrahidro isoxazol-(4, 5-C)-piridin-7-carboxílico
HRP	peroxidasa de rábano
IgG	inmunoglobulina G
IP2	inositol 4,5-difosfato
IP3	inositol 1,4,5-trifosfato
I2-CA	ac. indol-2-carboxílico
JSTX	joro spider toxin (toxina de la araña <u>Nephila clavata</u>)
KA	ac. kainico
KYN	ac. quinurénico
MEM	Medio mínimo de Eagle
MK-801	(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d] ciclohepten-5,10-amino maleato
NMDA	N-metil-D-aspartato

NO nervio óptico
NSE enolasa específica de neuronas
PBS solución salina amortiguada con fosfatos
PCP fenilciclidina
PDA cis-2,3-piperidina dicarboxilato
PKC proteína cinasa C
PLA2 fosfolipasa A2
PLC fosfolipasa C
QA ac. quisquálico
QUIN ac. quinolínico
SDS duodecil sulfato de sodio
SNC Sistema Nervioso Central
TCP tienil ciclohexil piperidina
TT toxina tetánica

RESUMEN

Los aminoácidos excitadores (AAE), en particular los ácidos glutámico (glu) y aspártico (asp) se han propuesto como los neurotransmisores utilizados en las vías principales de transmisión de la información en la retina de los vertebrados. En el Sistema Nervioso Central (SNC), se ha sugerido que además de su papel como posibles neurotransmisores, estos compuestos ejercen funciones tróficas durante la diferenciación celular. Asimismo, se ha demostrado la participación de los AAE en funciones superiores de integración como la memoria y el aprendizaje, así como en varias enfermedades de tipo convulsivo y neurodegenerativo en las que estas funciones se ven alteradas. Consecuentemente, el estudio del funcionamiento de los receptores con los receptores con los cuales interactúan estos compuestos, así como de sus mecanismos de regulación, ha cobrado gran importancia.

Uno de los enfoques para abordar este problema es el estudio de los mecanismos que regulan durante el desarrollo ontogenético, la aparición y la adquisición de las características definitivas de estos receptores. Así, el objetivo de este trabajo fue la caracterización de los tres tipos de receptores, para los AAE, que determinan su actividad como neurotransmisores durante el desarrollo ontogenético de la retina: receptores sinápticos, sitios de captación y autorreceptores. Estos estudios se llevaron a cabo paralelamente en la retina aislada del pollo durante el desarrollo embrionario (DE), e in vitro, en cultivos primarios de células de la retina.

Por lo que se refiere a los receptores sinápticos, se caracterizó desde el punto de vista cinético y farmacológico la unión específica de $^3\text{H-Glu}$ y $^3\text{H-Asp}$ como agonistas de todos los subtipos de receptores para AAE, y $^3\text{H-AMPA}$ como marcador de los receptores de Glu de tipo quisquálico tanto en membranas aisladas de la retina de embriones de pollo de diferentes edades, como en cultivos enriquecidos en neuronas o células gliales de la retina. Los resultados muestran que los receptores caracterizados farmacológicamente con los diferentes agonistas aparecen en distintos momentos de la diferenciación celular y, en el caso de la unión de Asp y Glu, su número varía a lo largo del desarrollo. En el caso de la unión específica de AMPA, entre los días 7 y 8 encontramos una variación no sólo en el número, sino también en la afinidad de estos receptores. Junto con los cambios cinéticos, estos receptores sufren modificaciones en sus propiedades farmacológicas adquiriendo especificidad a lo largo de la diferenciación, de manera que un día después de la eclosión pueden identificarse ya los cuatro subtipos que se han caracterizado en el SN de animales adultos.

La captación se caracterizó midiendo la acumulación de $^3\text{H-D-Asp}$ en cultivos enriquecidos en neuronas o células gliales de la retina. Se encontró que existen dos sistemas de captación para AAE en la retina: uno de alta afinidad ($K_m = 8-13 \mu\text{M}$) en las neuronas y otro de baja afinidad ($K_m = 100-134 \mu\text{M}$) en las células gliales. A diferencia de lo que ocurre con los receptores sinápticos, los sitios de captación aparecen en etapas muy tempranas del DE (antes del día 7 de incubación); sin embargo, su número aumenta considerablemente durante la diferenciación. En

el sistema de alta afinidad, paralelamente a la maduración morfológica de las neuronas se da un aumento en la afinidad de los inhibidores más potentes de la captación, así como en la sensibilidad a los inhibidores metabólicos.

En cuanto a la liberación de AAE y su regulación a través de autorreceptores durante el DE, se encontró la máxima liberación de ³H-D-Asp en respuesta a la despolarización por alto K⁺ al principio del desarrollo. Esta liberación es independiente de Ca⁺⁺ y se potencia al añadir ácido kaínico en el medio de estimulación. Paralelamente al inicio de la sinaptogénesis en la retina de pollo, se invierte el efecto de los distintos análogos de los AAE sobre la liberación y, al añadirlos en el medio de estimulación, la inhiben. La dependencia de Ca⁺⁺ se adquiere paulatinamente en las dos primeras semanas de incubación hasta alcanzar el 80% característico del adulto a los 14 días DE y, al mismo tiempo, hay un aumento en la liberación espontánea de D-Asp que alcanza su valor máximo al día 18, momento en el cual se adquiere la sensibilidad al NMDA.

ABSTRACT

Excitatory amino acids (EAA) have been proposed as putative transmitters in the vertical pathway of the vertebrate retina. In the CNS, besides their role as neurotransmitters a role as trophic factors in critical stages of development has been demonstrated, as well as their involvement in learning and memory and several neurodegenerative disorders. For this reason, it has become very important to understand the mechanisms which regulate the EAA receptors.

One approach to this problem is to study the mechanisms which, under normal conditions, regulate the appearance and acquisition of the final characteristics of these receptors during embryonic development (ED). Thus, the present study is aimed to characterize, for EAA, the three kinds of receptors which determine neurotransmitter function, i.e. synaptic, uptake, and autoreceptors during both in vivo - along ED - and in vitro - in primary cultures - differentiation of retinal cells.

Regarding synaptic receptors, we determined the kinetic and pharmacological properties of ^3H -Glu, ^3H -Asp and ^3H -AMPA specific binding in frozen membranes from chick embryo retinas, and in neuron-enriched or glial cell-enriched retinal cultures in different developmental stages. Specific binding of these agonists appeared in different moments of ED, and the number of binding sites for ^3H -Glu and ^3H -Asp increases with differentiation. Receptors which bind AMPA vary both in number and affinity between days 7 and 8 ED. Along with kinetic changes, these receptors acquire pharmacological specificity so that in

the newborn, the four receptor subtypes which have been described in the adult nervous system can be identified.

Uptake was characterized by $^3\text{H-D-Asp}$ accumulation in neuron- or glial cell-enriched retinal cultures. A high-affinity uptake system ($K_m = 8-13 \mu\text{M}$) was found in neurons, and a low-affinity system ($K_m = 100-134 \mu\text{M}$) in glial cells. Uptake receptors appear in early stages (before day 7 ED), and their number increases significantly during development. In the high-affinity uptake system, an increase in the affinity for the most potent inhibitors and in the sensitivity to metabolic inhibitors was found, paralleling the morphological maturation of neurons.

As for EAA release (measured with $^3\text{H-D-Asp}$) and its regulation through autoreceptors during ED, we found the highest release due to K^+ depolarization at 7-8 days ED. Kainate, when added to the depolarizing medium, potentiates this release. When synaptogenesis starts in the retina, an opposite effect of EAA was found so that, when added to the stimulation medium, they inhibited $^3\text{H-D-Asp}$ release. Ca^{++} -dependence is acquired during the first two weeks of incubation and, by day 14 ED, $^3\text{H-D-Asp}$ release is, as in the adult, 80% Ca^{++} -dependent. At the same time there is an increase in the spontaneous release of D-Asp which reaches a peak at day 18 ED, when the sensitivity to NMDA appears.

INTRODUCCION

Los "aminoácidos excitadores" (AAE), en particular los ácidos glutámico (glu) y aspártico (asp), se han propuesto como los mediadores de la mayor parte de la transmisión excitadora en el Sistema Nervioso Central. Además de su posible función como neurotransmisores, se ha sugerido que estos compuestos ejercen funciones tróficas durante la diferenciación celular y participan en funciones superiores de integración como la memoria y el aprendizaje (Somohano y López Colomé, 1989). Sin embargo, en condiciones en las que la homeostasis se altera, estos aminoácidos pueden producir la muerte celular. Así, desbalances en la concentración de estos aminoácidos o algunas alteraciones en los receptores con los que interactúan se han asociado a patologías del Sistema Nervioso, en particular a aquellas de tipo convulsivo y degenerativo como la epilepsia, las enfermedades de Huntington y de Alzheimer, la atrofia olivopontocerebelar o el daño celular producido en un cuadro de isquemia/hipoxia. En la mayor parte de estos casos, se desconoce el proceso que lleva a un mal funcionamiento del metabolismo de estos aminoácidos o de sus receptores; consecuentemente, el estudio del funcionamiento de los diferentes tipos de receptores con los cuales interactúan los AAE, así como de sus mecanismos de regulación ha cobrado gran importancia.

En los últimos años se ha demostrado que los niveles de algunos metabolitos y las propiedades de varias proteínas celulares se modifican durante el desarrollo ontogenético. El

conocimiento de los mecanismos que originan la conformación y funcionamiento definitivos de los componentes membranales (los transportadores, los canales iónicos, los receptores, etc.) permite entender su regulación en el adulto y encontrar nuevas estrategias terapéuticas para aquellos casos en que se encuentren alterados. Con este enfoque, en este trabajo se estudió la maduración bioquímica de los distintos tipos de receptores para AAE (receptores sinápticos, autorreceptores y sitios de captación de alta afinidad) durante la diferenciación celular. Estos estudios se llevaron a cabo paralelamente en la retina aislada de pollo, durante el desarrollo embrionario (DE), e in vitro, en cultivos primarios de la retina.

I. CLASIFICACION DE LOS RECEPTORES PARA AAE

En el Sistema Nervioso, los ácidos glutámico y aspártico interactúan con al menos dos tipos generales de receptores distinguibles entre sí tanto bioquímica como electrofisiológicamente (Cotman y Monaghan, 1987). El nombre que se dió a estos dos receptores derivó de la capacidad de un análogo del ácido aspártico, el N-metil-D-aspartato (NMDA) de interactuar con un tipo de receptor y no con el otro; así, los conocemos como los receptores de tipo NMDA y los de tipo NO-NMDA, y a pesar de que más tarde se demostró que este compuesto no es el agonista más potente del receptor de NMDA, el nombre se conserva. Existe también otra clasificación para estos receptores que deriva del hecho de que tanto los receptores de NMDA como los de NO-NMDA pueden actuar a través de mecanismos ionotrópicos (aumentando la conductancia a iones) o metabotrópicos (a través de segundos

mensajeros intracelulares). A este respecto, el grupo de Costa (1988) ha sugerido que se denomine a los receptores de NMDA G1 y a los de NO-NMDA G2, con un subíndice que se refiere al mecanismo de transducción de la señal: Gc para los que aumentan la conductancia a cationes, Gp para los que inducen la hidrólisis del fosfatidil inositol, y Ga para los que inducen la producción de ácido araquidónico. Una característica particular de estos receptores es que existe evidencia tanto electrofisiológica (Mayer y Westbrook, 1985; Cull-Candy y Usowicz, 1987; Nawy y Copenhagen, 1987) como bioquímica (Fagg y Matus, 1984) que demuestra que ambos tipos de receptores (NMDA y NO-NMDA) están presentes simultáneamente en la misma postsinapsis.

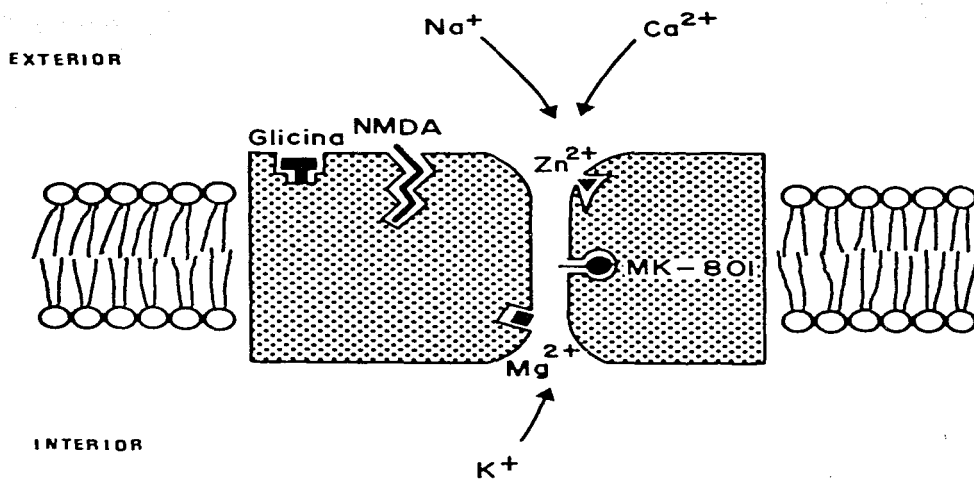
1. RECEPTORES DE NMDA.

En el SNC, los sitios de unión de NMDA se localizan preferentemente en la corteza, los ganglios basales y las áreas asociadas a los sistemas sensoriales. Los niveles más altos se encuentran en el área CA1 del hipocampo, en la que hacen sinapsis las aferentes de las colaterales de Schaffer. (Monaghan y Cotman, 1985).

El receptor de NMDA parece ser una proteína oligomérica con un peso molecular de alrededor de 200 KD constituida por un canal catiónico poco selectivo y al menos cinco sitios distintos de reconocimiento con los que interactúan el neurotransmisor, un agonista alostérico (la glicina o la D-serina), los antagonistas alostéricos (los anestésicos disociativos) y los iones Mg^{++} y Zn^{++} (Fig. 1). Debido a esto se le ha comparado con el receptor para el GABA (receptor $GABA_A$) e incluso se ha postulado que ambos

FIGURA 1

MODELO DEL RECEPTOR DE TIPO NMDA



El receptor de NMDA parece ser una proteína oligomérica que presenta, además del sitio de reconocimiento para el neurotransmisor o agonistas (NMDA), un sitio para moduladores alostéricos positivos (glicina), un canal catiónico poco selectivo y, en éste, un sitio para moduladores alostéricos negativos (MK-801) y dos sitios para los iones Mg^{++} y Zn^{++} que bloquean el paso de otros cationes por el canal y, en el caso del Mg^{++} , le confieren una dependencia de voltaje.

podrían derivar de una misma familia de genes, ya que el receptor GABA_A también presenta un canal (en este caso para el Cl⁻), un sitio para el neurotransmisor y sitios alostéricos con los que interactúan las benzodiazepinas y los barbitúricos. Sin embargo, en el caso del receptor de NMDA, la interacción del Mg⁺⁺ con el canal le confiere, además, una dependencia de voltaje, lo cual lo vuelve aún más complejo. Los principales agonistas y antagonistas específicos de los distintos sitios se muestran en la Tabla 1 (Foster y Fagg, 1984). Se ha propuesto la existencia de dos estados distintos del receptor de NMDA (Monaghan et al., 1988): uno que presenta mayor afinidad por los agonistas y otro con mayor afinidad por los antagonistas. El primero predomina en el cerebelo, estriado medio y las capas corticales más superficiales, mientras que el tálamo está enriquecido con la segunda población. Estos dos estados podrían corresponder a dos conformaciones de un mismo receptor o bien a dos poblaciones distintas de receptores.

La activación del receptor de NMDA provoca la despolarización de las células tanto por mecanismos ionotrópicos como metabotrópicos, aunque no se ha aclarado si el mismo complejo molecular es responsable de los distintos mecanismos de transducción, o bien se trata de dos receptores diferentes. La interacción del neurotransmisor con los receptores Gcl despolariza a las células por un mecanismo ionotrópico, aumentando la conductancia a cationes (Ca⁺⁺, Na⁺ y K⁺). La activación de los receptores Gpl induce la hidrólisis del fosfatidil inositol, la cual genera fosfatos de inositol que actúan como segundos

TABLA 1
RECEPTORES DE TIPO NMDA

SITIO DEL NEUROTRANSMISOR

AGONISTAS

L-ASPARTATO*
L-GLUTAMATO*
N-METIL-D-ASPARTATO
QUINOLINATO*
HOMOCISTEATO*

ANTAGONISTAS

CPP
APV
APH
CGS-19755

SITIO ALOSTERICO POSITIVO

AGONISTAS

GLICINA*
D-SERINA
D-CICLOSERINA
ACC

AGONISTA INVERSO

7-Cl-QUINURENATO
QUINURENATO
CNQX

ANTAGONISTAS

HA-966
I2-CA
ACBC

SITIO ALOSTERICO NEGATIVO

AGONISTAS

FENILCICLIDINA
MK-801
KETAMINA
ENDOPSICOSINA*

La tabla muestra la mayor parte de los compuestos de origen tanto natural (*) como sintético (los demás) que interactúan con el receptor de tipo NMDA y su clasificación como agonistas, agonistas inversos o antagonistas de los distintos sitios de reconocimiento del receptor. ACBC - ac. 1-amino ciclobutano-1-carboxílico; ACC - ac. 1-amino ciclopropano-1-carboxílico; APV - ac. 2-amino-5-fosfonovalérico; APH - ac. 2-amino-7-fosfonoheptanoico; CGS-19755 - ac. cis-4-(fosfonometil)-2-piperidín carboxílico; CNQX - 6-ciano-7-nitroquinoxalín-2,3-diona; CPP - ac. 3(2-carboxipiperazín-4-yl)propil-1-fosfónico; HA-966 - 1-hidroxi-3-aminopirrolidona-2; I2-CA - ac. indol-2-carboxílico; MK-801 - (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cicloheptén-5,10-amino maleato.

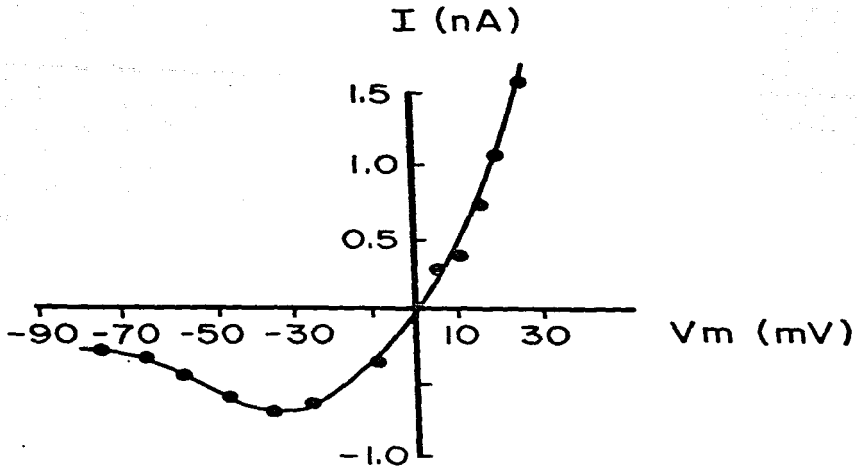
mensajeros, y mediante los receptores G α 1 se activa la fosfolipasa A₂ con la consiguiente producción de ácido araquidónico (Costa et al, 1988).

Con base en experimentos bioquímicos y electrofisiológicos se ha propuesto el siguiente mecanismo para el funcionamiento de los receptores G α 1: Cuando la célula se encuentra en reposo, la concentración fisiológica de Mg⁺⁺ bloquea el canal iónico del receptor, de tal manera que la interacción del transmisor con su receptor no tiene ningún efecto. Sin embargo, cuando la célula se excita por la acción de algún neurotransmisor (ya sea un AAE interactuando con los receptores de tipo NO-NMDA o bien otro transmisor excitador), la despolarización de la membrana induce la salida del Mg⁺⁺ del canal, y permite su apertura por el transmisor. En una curva corriente vs voltaje (I/V) en presencia de NMDA, esto se observa como una dependencia de voltaje en la apertura del canal (Mayer et al, 1984). (Fig. 2).

Se ha propuesto que el neurotransmisor endógeno que interactúa con el receptor de NMDA pudiera ser el ácido aspártico o bien el ácido quinolínico, un producto del metabolismo del triptofano. Dicho transmisor al interactuar con el receptor provoca la apertura del canal; sin embargo, en muchos casos se sabe que, para que esta interacción sea fisiológicamente significativa, es necesario que la glicina ocupe el sitio alostérico (Kleckner y Dingledine, 1988). El papel fundamental que juega la glicina en la actividad del receptor de NMDA ha sido difícil de aclarar, ya que la concentración fisiológica del aminoácido (medida en el líquido cefalorraquídeo por Ferraro y

FIGURA 2

CURVA I/V DEL RECEPTOR DE NMDA



Al estimular una célula con NMDA y graficar las corrientes (I) que se obtienen en función del potencial de membrana (Vm) se observa una zona de conductancia negativa a potenciales menores a -30 mV, de manera que la apertura de los canales asociados a este receptor depende tanto de la presencia del transmisor como del Vm. En el caso del receptor de NMDA, la dependencia de voltaje se debe al bloqueo del canal catiónico por el Mg^{++} a potenciales más electronegativos. Esta curva se obtuvo en una preparación de neuronas de médula espinal en cultivo, sometida a control de voltaje.

(Tomado de Mayer, M.L. y G.L. Westbrook. (1985). J. Physiol. (Lond) 361: 65-90.

Hare (1985)), es suficiente para saturar el sitio (Kleckner y Dingleline, 1988). Al registrar la actividad unitaria de los canales asociados al receptor del NMDA en presencia de glicina, se observa un aumento en la frecuencia de apertura del canal (Johnson y Asher, 1987). Recientemente Mayer y col. (1989) demostraron que los receptores de NMDA se desensibilizan con un curso temporal lento y la glicina acelera la recuperación del estado desensibilizado, lo cual permite que el canal se abra con mayor frecuencia. Tanto la frecuencia como el tiempo de apertura del canal están regulados por el sitio alostérico negativo. La fenilciclídina (PCP), a bajas concentraciones, disminuye la frecuencia de apertura del canal, mientras que a altas concentraciones disminuye el tiempo de apertura (Bertolino et al., 1988). En experimentos bioquímicos, el efecto de la glicina sobre el canal se ha visto como un aumento en los sitios de unión de ^3H -tienil ciclohexil piperidina (^3H -TCP) (Snell et al., 1987) y ^3H -metil dihidro dibenzo cicloheptén amino maleato (^3H -MK-801) (Reynolds et al., 1987). El compuesto endógeno que se ha propuesto que interactúa con este sitio es la endopsicosina (Contreras et al., 1987).

El Zn^{++} proporciona un bloqueo adicional a este receptor (Westbrook y Mayer, 1987). Se sabe que en algunas terminales que liberan glutámico, el Zn^{++} se libera junto con éste (Assaf y Chung, 1984; Howell et al., 1984). Esto tendría como consecuencia que el glutámico ejerciera su acción en la célula postsináptica a través de los receptores de tipo NO-NMDA, y se ha postulado que podría ser un mecanismo mediante el cual se protegiera a las

células postsinápticas de una sobreexcitación por los AAE (Peters et al, 1987).

Receptores tipo Gpl

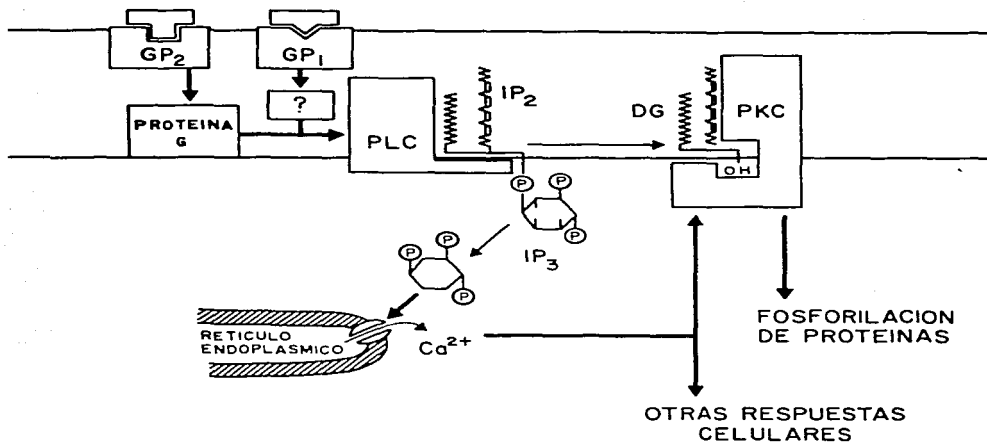
La despolarización debida a la activación de los receptores Gpl deriva principalmente del aumento del Ca^{++} intracelular inducido por los fosfatos de inositol generados por la degradación del fosfatidil inositol de la membrana. No se ha establecido el mecanismo mediante el cual el receptor se acopla con la fosfolipasa C (PLC) responsable de la hidrólisis, ya que, al parecer, este acoplamiento no está mediado por proteínas G (Nicoletti et al, 1988). El aumento de Ca^{++} intracelular desencadena una cascada de fosforilaciones a través de la activación de cinasas dependientes de Ca^{++} , en particular la proteína cinasa C (PKC), produciéndose así una serie de segundos mensajeros intracelulares (Fig. 3), modificándose no sólo la permeabilidad de la membrana, sino el metabolismo de la célula en general.

Receptores tipo Gal

Los receptores Gal se han descrito recientemente y aún no están muy bien caracterizados. Se sabe que la activación de los receptores de NMDA provoca un aumento en la liberación tanto de ácido araquidónico como de sus metabolitos (Dumuis et al, 1988). Este aumento en la concentración de ácido araquidónico se debe a la activación de la vía directa de producción de araquidonato mediante la activación de la fosfolipasa A_2 y no a una consecuencia de la producción de diacilglicerol a través de los receptores Gpl (Lazarewicz et al, 1988) (Fig. 4). Tanto el ácido araquidónico que se produce, como sus metabolitos (principalmente

FIGURA 3

HIDROLISIS DE FOSFATIDIL INOSITOL A TRAVES DE LA ACTIVACION
DE LOS RECEPTORES Gp PARA AMINOACIDOS EXCITADORES

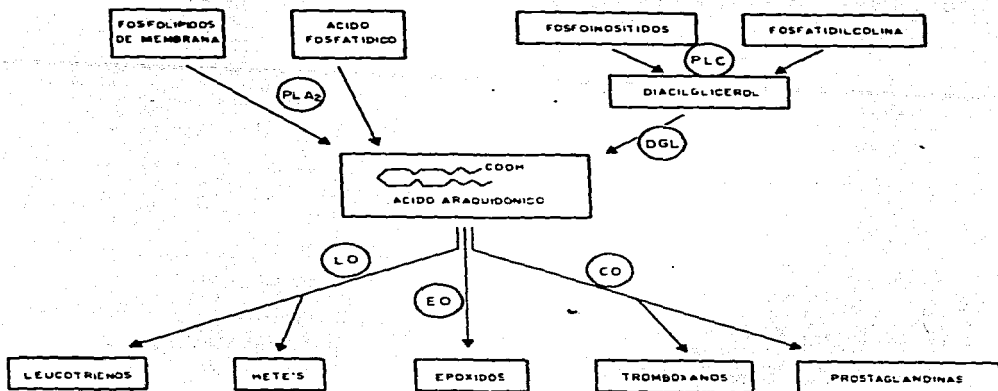


Los AAE, al interactuar con receptores sinápticos de tipo Gp1 (NMDA) ó Gp2 (NO-NMDA) inducen la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la hidrólisis de fosfatidil-inositol 4,5-difosfato (IP₂) produciéndose diacil glicerol (DG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) que actúan, a su vez, como segundos mensajeros provocando tanto la activación de enzimas como la proteína cinasa C (PKC), como la liberación de Ca⁺⁺ del retículo endoplásmico.

(Modificado de: Mitchell, R.H. en Inositol lipids in cellular signaling (Mitchell, R.H. y J.W. Putney, Eds.) Cold Spring Harbor, 1987.)

FIGURA 4

METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO



Los AAE inducen la producción de ácido araquidónico específicamente al interactuar con los receptores Gal y activar a la fosfolipasa A₂ (PLA₂), o bien en forma inespecífica, al interactuar con los receptores Gp1 ó Gp2 y activar a la fosfolipasa C (PLC). El ácido araquidónico, por la acción de las enzimas lipoxigenasa (LO), epoxigenasa (EO) y cicloxigenasa (CO) origina una serie de metabolitos que pueden actuar como segundos mensajeros intracelulares modificando canales, receptores y otras proteínas de membrana, o bien, pueden salir de la célula y actuar como mensajeros primarios interactuando con receptores específicos en células vecinas. HETE's: acs. hidroxieicosatetraenoicos. DGL: diglicérido lipasa.

Modificado de Axelrod et al. (1988). Trends in Neurosci. 11(3): 117-123.

las prostaglandinas y los leucotrienos) pueden estimular otros sistemas de segundos mensajeros como el AMPc y el GMPc a través de la activación de las ciclasas, elevar las concentraciones citosólicas de Ca^{++} y activar de manera directa a la PKC y a la PLC (Axelrod et al, 1988), o bien, pueden liberarse y actuar como mensajeros primarios interactuando con receptores membranales en otras células o en la misma célula que los libera.

2. RECEPTORES NO NMDA.

Bajo este nombre se agrupa a tres subtipos de receptores para AAE: los llamados de tipo quisquálico (QA), de tipo kaínico (KA) y de tipo del amino-fosfono-butirato (APB), de acuerdo con el agonista más potente para cada subtipo. Esta agrupación se debe a que comparten un agonista (el Glu) y un antagonista (la cianoquinoxalín 2,3-diona (CNQX)), y por otro lado, la curva I/V que se obtiene al estimular cualquiera de estos receptores es muy similar y no presenta dependencia de voltaje. Por este motivo, y debido también a que no se conoce la secuencia de aminoácidos de estos receptores, no se ha propuesto un modelo esquemático, como en el caso del receptor de NMDA. Sin embargo, existen diferencias tanto farmacológicas (Foster y Fagg, 1984) como de distribución (Monaghan et al, 1983) que permiten distinguir a los tres subtipos entre sí, como se muestra en la Tabla 2.

Los receptores de tipo APB se distinguen de los de KA y QA por su dependencia iónica, ya que sólo pueden detectarse en presencia de Cl^{-} y aumentan paralelamente al aumento de las concentraciones de Ca^{++} en el medio (Butcher et al, 1983). Por otra parte, y a diferencia de lo que ocurre en la mayor parte de

TABLA 2
RECEPTORES TIPO NO NMDA

RECEPTORES DE TIPO QA

<u>AGONISTAS</u>	<u>ANTAGONISTAS</u>	<u>DISTRIBUCION</u>
QUISCUALATO AMPA L-GLUTAMATO β -ODAP	GDEE JSTX CNQX	AREA CA1 DEL HIPOCAMPO CORTEZA CEREBRAL GANGLIOS BASALES AREAS SENSORIALES EN EL SNC

RECEPTORES DE TIPO KA

<u>AGONISTAS</u>	<u>ANTAGONISTAS</u>	<u>DISTRIBUCION</u>
KAINATO DOMOATO L-GLUTAMATO AC. ACROMELICO	PDA γ -GLUTAMILGLICINA GAMS CNQX QUINURENATO	HIPOTALAMO CAPAS CORTICALES PROFUNDAS NUCLEO RETICULAR DEL TALAMO CUERPOS MAMILARES NUCLEO DEL PUENTE FIBRAS MUSGOSAS DEL HIPOCAMPO

RECEPTORES DE TIPO APB

<u>AGONISTAS</u>	<u>ANTAGONISTAS</u>
APB L-GLUTAMATO	CNQX

En la tabla se muestran los agonistas y antagonistas de los distintos subtipos de receptores NO-NMDA: quisquálico (QA), kaínico (KA) y amino-fosfono butirato (APB), así como su distribución en el Sistema Nervioso Central. AMPA - ac. α -amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; β -ODAP - ac. β -N-oxalyl-L- α , β -diamino propiónico; CNQX - 6-ciano-7-nitroquinoxalín-2,3-diona; GAMS - γ -D-glutamil amino metil sulfonato; GDEE - dietil ester del ac. glutámico; JSTX - "joro spider" toxin; PDA - cis-2,3-piperidín dicarboxilato.

los receptores sinápticos, los receptores de tipo APB no pueden detectarse en membranas previamente congeladas. Estas particularidades han hecho que muchos autores consideren que los receptores de APB son sitios de captación de ácido glutámico y no receptores sinápticos (Pin et al, 1984), con lo cual quedarían excluidos de la clasificación anterior. Sin embargo, y como la evidencia de que son receptores sinápticos también es bastante fuerte (Honoré et al, 1986; Slaughter y Miller, 1981) se prefiere considerarlos como un subtipo de los receptores NO-NMDA.

Por su mecanismo de transducción (ionotrópico o metabotrópico), los receptores de NO-NMDA se han clasificado también como Gc2 (aquellos que aumentan la conductancia a cationes, principalmente a Na^+ y a K^+) y como Gp2 (los que actúan a través de la hidrólisis del fosfatidil inositol) (Costa et al, 1988). Por otra parte, se ha observado que los agonistas de los receptores NO-NMDA elevan la concentración de nucleótidos cíclicos en algunas áreas del SNC como el cerebelo (Foster y Roberts, 1981; Novelli et al, 1987) y la retina (Anand et al, 1985).

II. LA RETINA COMO MODELO

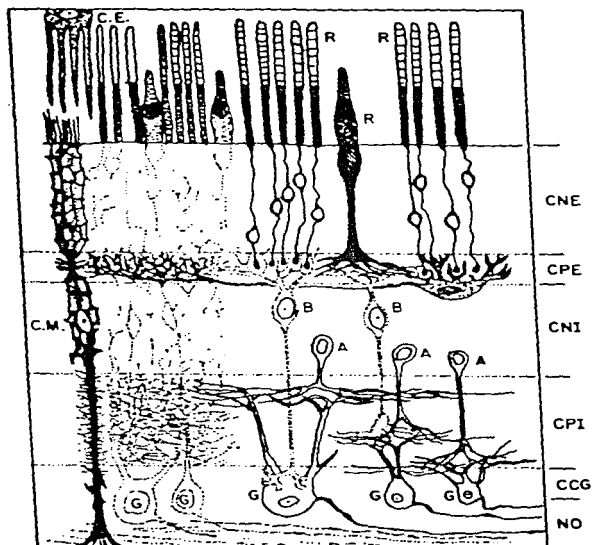
La retina presenta varias ventajas que permiten utilizarla como modelo para investigar fenómenos cuyo estudio se complicaría en otras áreas del Sistema Nervioso. Además de su accesibilidad y la facilidad de mantenerla in vitro por tiempos relativamente prolongados con un mínimo daño celular, en el caso de los receptores para AAE existe evidencia tanto fisiológica (Dowling y Ripps, 1973; Murakami et al., 1975; Gershenfeld y Piccolino,

1979) como bioquímica (Shiells et al., 1981; López Colomé, 1981; López Colomé y Somohano, 1982) de que el transmisor utilizado en la vía principal de transmisión de información de la retina pudiera ser glu, asp o una molécula similar al ácido kaínico y, por lo tanto, la retina es uno de los pocos órganos en los que todas las células presentan receptores para AAE.

La retina de los vertebrados está constituida por seis tipos celulares (Fig.5): cinco clases de neuronas (los fotorreceptores, las células bipolares, las horizontales, las amacrinas y las ganglionares) y un tipo de célula glial, las células de Müller. Histológicamente, los cinco tipos neuronales están dispuestos en tres capas celulares interrumpidas por dos espacios sinápticos, la capa plexiforme externa (CPE) y la interna (CPI). En la primera capa celular, la capa nuclear externa (CNE), se localizan los cuerpos de los fotorreceptores y de las células horizontales. En la CPE, estas células hacen contacto con las terminaciones de las células de la siguiente capa nuclear, la capa nuclear interna (CNI) constituida por las células bipolares y amacrinas. Estas últimas, a su vez, hacen contacto (en la CPI) con las células ganglionares y algunas amacrinas desplazadas que constituyen la última capa celular, la de las células ganglionares (CCG), cuyos axones se unen para formar el nervio óptico (NO). En algunos vertebrados, como los teleosteos y los monos del nuevo mundo, se ha descrito otro tipo celular, las células interplexiformes, que liberan dopamina y atraviesan la retina verticalmente comunicando ambas capas plexiformes (Dowling, 1979).

La información en la retina se transmite en sentido vertical

FIGURA 5
TIPOS CELULARES DE LA RETINA



Los diferentes tipos de neuronas de la retina: fotorreceptores (R), células horizontales (H), células bipolares (B), células amacrinas (A) y células ganglionares (G) se encuentran distribuidas en 3 capas celulares: la capa nuclear externa (CNE), la capa nuclear interna (CNI) y la capa de células ganglionares (CCG), cuyos axones forman el nervio óptico (NO). Estas capas están interconectadas en dos capas plexiformes: la externa (CPE) y la interna (CPI). En la retina de las aves existe un sólo tipo de célula glial: las células de Müller (CM). CE = célula del epitelio pigmentario.

Modificado de Ramón y Cajal en Neurocircuitry of the Retina. A Cajal Memorial. (Gallego, A. y Gouras, P. Eds.) Elsevier, New York, 1985.

de los fotorreceptores a las células bipolares y a las ganglionares y se modula por la actividad de las interneuronas amacrinas y horizontales de la siguiente manera:

En la oscuridad, los fotorreceptores se encuentran parcialmente despolarizados debido a una entrada continua de Na⁺ (conocida como la corriente oscura de sodio) a sus segmentos externos (Hagins, 1979). Esto provoca la liberación continua de un neurotransmisor de tipo excitador que interactúa con receptores sinápticos en las células bipolares y horizontales. De acuerdo con su respuesta al neurotransmisor liberado por los fotorreceptores, las células bipolares se dividen en dos poblaciones: las bipolares "OFF", que se despolarizan con el transmisor y liberan entonces su propio transmisor, (también excitador), hacia las amacrinas y las ganglionares, y las bipolares "ON", que se hiperpolarizan con el transmisor. La respuesta de las bipolares no está determinada únicamente por el efecto directo del transmisor de los fotorreceptores sobre ellas, sino también por el neurotransmisor inhibitor liberado por las células horizontales (muy probablemente GABA, en los vertebrados no mamíferos) que actúa sobre las bipolares modulando su respuesta (Dacheux et al., 1979).

Las células ganglionares, al igual que las bipolares, se dividen en "OFF", "ON" u "ON-OFF" según se despolaricen o no con el transmisor liberado en la oscuridad por la bipolares "OFF" (Bloomfield y Miller, 1986). En este paso, son las células amacrinas las que modulan la información liberando distintos neurotransmisores (ya sea excitadores o inhibidores) según la población de amacrinas de que se trate (se han descrito al menos

siete poblaciones de células amacrinas de acuerdo con el neurotransmisor que liberan) (Wunk y Werblin, 1979).

Al incidir la luz sobre la retina, se interrumpe la entrada de sodio a los fotorreceptores con lo cual éstos se hiperpolarizan y el transmisor deja de liberarse. Esto provoca la hiperpolarización de las bipolares "OFF" y la despolarización de las "ON", que liberan así su propio neurotransmisor hacia las ganglionares "ON" y "ON-OFF" (Scheller et al., 1986).

Los aminoácidos parecen ser los neurotransmisores más utilizados en la retina de los vertebrados: aminoácidos excitadores (glu, asp o una molécula similar) en el caso de los fotorreceptores, bipolares y ganglionares (Morgan, 1983), y aminoácidos inhibidores: GABA en el caso de las horizontales y una población de amacrinas, y glicina para otra población de amacrinas (Neal, 1976). Otros neurotransmisores como la acetilcolina, la dopamina y algunos neuropéptidos se liberan únicamente por sendas poblaciones de células amacrinas y, como se indicó anteriormente, en algunas especies se encuentran las células interplexiformes que liberan dopamina (Brecha, 1983).

III. EMBRIOGENESIS DE LA RETINA DE POLLO

1. ESTUDIOS HISTOLOGICOS.

La embriogénesis de la retina de pollo ocurre de la siguiente manera (Meller, 1984):

Primera semana (estadios 1-31 según Hamburger y Hamilton (1951)):

La invaginación de la copa óptica entre los días 1 y 2 de desarrollo embrionario (DE) da lugar a dos capas celulares de origen ectodérmico. De éstas, la capa interna es la que da

origen a la retina neural. Entre los días 3 y 6 DE se da el mayor índice de mitosis y pueden distinguirse tres tipos celulares:

- a) células ovoides, que se localizan cerca de la superficie ventricular y están en mitosis activa.
- b) células monopolares-bipolares, que se adhieren a la superficie ventricular por medio de una prolongación apical y tienen prolongaciones basales con una terminación plana que puede considerarse como un cono de crecimiento.

Las células germinales son indistinguibles entre sí y por lo tanto no es posible señalar a los precursores de los distintos tipos celulares. Las primeras células que dejan de dividirse van a dar origen a las células ganglionares. El detener su ciclo mitótico parece ser la señal para que las células emigren hacia la zona marginal y es durante esta migración que ocurre la diferenciación y adquieren el aspecto morfológico característico de las neuronas adultas. Al terminar la primera semana de desarrollo, la mayoría de las células son ya postmitóticas y pueden considerarse como neuroblastos, aunque aún es posible encontrar células dividiéndose al día 12 DE. Las últimas células en abandonar el ciclo mitótico son las que darán origen a las células bipolares y de Müller.

Entre los días 7 y 8 DE, las células ganglionares alcanzan la superficie vitreal y sus arborizaciones comienzan a formar lo que será la CPI.

Segunda semana (Estadios 32 al 40):

Uno de los eventos más importantes en este periodo es el

inicio de la diferenciación de los fotorreceptores a partir de las células que no emigraron de la superficie ventricular. El proceso completo de diferenciación abarca tanto la segunda como la tercera semana de incubación y pueden distinguirse tres etapas:

- a) la formación del segmento interno (alrededor del día 12 DE).
- b) la formación del segmento externo (alrededor del día 16 DE).
- c) el establecimiento de sinapsis con las células bipolares y horizontales (alrededor del día 19 DE).

Entre los días 9 y 10 DE es posible identificar las primeras células amacrinas en la porción basal de la CPI. Hinds y Hinds (1978) describieron la migración de las células amacrinas y observaron que, en una primera etapa, llegan hasta la capa de células ganglionares y posteriormente se dirigen hacia la región ventricular, a la CNI; esto explica la existencia de algunas células amacrinas que permanecen en la CCG en la retina de animales adultos.

Hacia el final de la segunda semana, las células horizontales se ramifican profusamente y comienza a formarse lo que será la CPE.

Tercera semana (Estadios 40 al 45):

Hacia el día 15 DE comienzan a entrelazarse las prolongaciones de las células bipolares y horizontales con los pies terminales de los fotorreceptores y en el día 16 se forma el cuerpo sináptico en listón en la porción basal de los fotorreceptores; sin embargo, el número de vesículas en éste no aumenta significativamente hasta los días 18 y 19 DE. Una vez que la retina adquiere la distribución celular y conectividad

características del adulto, es decir, hacia el día 19 DE, comienza a formarse la barrera hemato-retiniana.

Una característica interesante en el caso de las aves es que la retina embrionaria carece de vascularización y, por lo tanto, de astrocitos. Así, el único tipo de célula glial en la retina de las aves son las células de Müller. Como en el caso de los astrocitos, las células de Müller derivan de células totipotenciales que pueden dar origen tanto a neuronas como a células gliales. Los factores que inducen a estas células a expresar el genotipo de glioblastos se desconocen, sin embargo en algunas regiones del SNC como el nervio óptico, se sabe que las células precursoras pierden la capacidad de convertirse en neuronas cuando establecen contacto con los axones provenientes de la retina neural (Juurlink y Fedoroff, 1980). Las células de Müller se diferencian como tales en etapas muy tempranas, aún antes de la diferenciación neuronal, y forman una capa en el borde externo de la retina que posteriormente, en el adulto, constituirá la membrana limitante externa (Uga y Smelser, 1973). A pesar de que se ha propuesto que las células de Müller son un tipo de astrocito altamente especializado (Polyak, 1941), estas células comparten características tanto de astrocitos como de oligodendrocitos. Al igual que los astrocitos, las células de Müller presentan una alta actividad de la enzima glutamino sintetasa, así como los mecanismos de captación de alta afinidad y las enzimas de degradación de varios neurotransmisores. En etapas inmaduras, presentan inmunorreactividad contra la vimentina, pero no contra la proteína acídica fibrilar de la glía.

(GFAP), lo cual permitiría clasificarlas como protoastroblastos, según la terminología propuesta por Fedoroff y col. (1984). La inmunorreactividad contra la GFAP (marcador de astroblastos y astrocitos maduros) se ha descrito en las células de Müller de algunas especies como la carpa (Bignami, 1984) y en la rata después de daño ocular (Bignami y Dahl, 1979). Sin embargo, las células de Müller presentan también marcadores que se consideran exclusivos de oligodendrocitos, como son por ejemplo una alta actividad de la enzima anhidrasa carbónica C (Chandour et al, 1979; Linser y Moscona, 1981) y la glicoproteína asociada a mielina. Debido a esto y puesto que las células de Müller son el único tipo de célula glial en la retina de las aves y el principal en la retina de los demás vertebrados, se ha propuesto que en este órgano desempeñan las funciones tanto de astrocitos como de oligodendrocitos (Newman, 1986).

2. ESTUDIOS IN VITRO.

La diferenciación morfológica de las células de retina en cultivo la ha seguido principalmente el grupo de Adler, que también estableció la técnica para obtener cultivos enriquecidos en neuronas o células gliales de la retina (Adler et al., 1982) dependiendo del sustrato utilizado y de la densidad a la que se siembren las células. En los cultivos de neuronas, la proporción relativa de los distintos tipos celulares depende del momento del DE en que se obtienen las retinas: así, si se utilizan embriones de 6 días DE en los que la migración de las células de la retina apenas empieza, se obtienen básicamente células fotorreceptoras en el cultivo, mientras que si la siembra se hace uno o dos días

después (cuando la mayoría de las células ya se han alejado de la superficie ventricular), se obtienen casi todos los tipos neuronales, en proporciones equivalentes a las que se encuentran en la retina completa. A partir de estas observaciones se llegó a la conclusión de que todas las células de la retina provienen de un precursor único y la diferenciación en uno u otro tipo celular la inducen los factores del entorno que encuentran en los distintos niveles de la migración (Adler y Hatlee, 1989). Así, las células que no emigran y por lo tanto no entran en contacto con los inductores, se diferencian en fotorreceptores.

IV. RECEPTORES PARA AAE EN LA RETINA DE ANIMALES ADULTOS

El estudio bioquímico de los receptores en preparaciones membranales aisladas consiste básicamente en medir la unión de un ligando radioactivo (a una concentración por debajo de su K_B) en una preparación de membranas del tejido en estudio y su desplazamiento por un exceso del mismo compuesto (o algún análogo) no radioactivo (Enna y Snyder, 1976). Preferentemente se utiliza como ligando radioactivo al agonista o antagonista más potente de la acción fisiológica del supuesto transmisor natural ya que estos compuestos no se metabolizan tan rápidamente como el verdadero transmisor. En el caso de no existir un agonista o antagonista con suficiente afinidad o especificidad, puede utilizarse el compuesto postulado como transmisor. Con esta técnica general es posible medir dos categorías de receptores:

a) sitios de captación: la interacción del ligando con estos sitios está en función de la presencia de iones sodio en el

medio, y se afecta con la congelación de las membranas, por lo cual los ensayos deben hacerse en membranas recién obtenidas, en un medio con glucosa y en presencia de Na^+ . Presentan constantes de afinidad en el orden micromolar.

b) receptores sinápticos: presentan constantes de afinidad en el orden nanomolar. La interacción ligando-receptor es independiente de Na^+ , energía y temperatura; por lo tanto, para diferenciarlos de los anteriores, los ensayos deben hacerse en membranas previamente congeladas y en un medio sin Na^+ y sin glucosa. Los receptores sinápticos se clasifican en dos grupos: postsinápticos y extrasinápticos; estos últimos comprenden a los autorreceptores, que se localizan en la porción de la célula que está liberando al transmisor y su acción regula la cantidad de transmisor liberado. Dado que este tipo de ensayo se hace en membranas aisladas en las que no es posible distinguir las que provienen de las células presinápticas de aquellas de origen postsináptico, con esta técnica no es posible saber si los receptores medidos corresponden a receptores post o extrasinápticos o a una mezcla de ambos. Por este motivo es necesario correlacionar los estudios bioquímicos con experimentos electrofisiológicos en los que es posible registrar a las células individualmente y estudiar la manera en que los distintos compuestos afectan su comportamiento.

1. RECEPTORES SINAPTICOS.

En estudios anteriores se caracterizaron bioquímicamente los receptores sinápticos para AAE en retinas de pollos adultos, determinando así sus propiedades en un estado que podríamos

llamar "maduro". Para esto se estudiaron las características de la unión específica de $^3\text{H-Glu}$ (López Colomé, 1981) y $^3\text{H-Asp}$ (López Colomé y Somohano, 1982) como agonistas generales de los receptores para AAE. Esto se hizo siguiendo la técnica que se describe en la sección de Métodos, tanto en membranas de retina completa y de fracciones subcelulares como en membranas de retinas de animales tratados (por inyección intraocular) con dosis crecientes de KA (López Colomé y Somohano, 1984). Este tratamiento elimina selectivamente a distintas poblaciones celulares dependiendo de la sensibilidad de las células al kainato (amacrinas y bipolares "OFF" > horizontales > bipolares "ON") (Morgan e Ingham, 1981), y permitió localizar los receptores para AAE en determinadas poblaciones celulares. Posteriormente, se repitieron estos estudios utilizando ligandos específicos para los distintos subtipos de receptores: $^3\text{H-}\alpha$ -amino hidroxil metil isoxazol propionato ($^3\text{H-AMPA}$) para los receptores de tipo QA (López Colomé y Somohano, 1987), $^3\text{H-kainato}$ ($^3\text{H-KA}$) para los de KA (Somohano et al., 1988) y $^3\text{H-carboxi}$ piperazin fosfonato ($^3\text{H-CPP}$) para los de NMDA (Fig. 6). De estos estudios se concluyó lo siguiente:

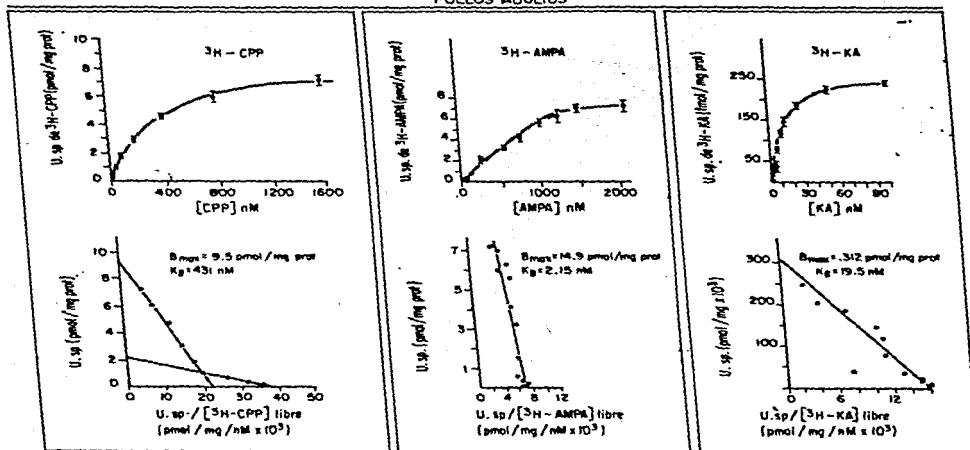
a) Estudios con ligandos generales:

En la retina de pollos adultos existen tanto receptores para $^3\text{H-Glu}$ como para $^3\text{H-Asp}$: La unión específica de $^3\text{H-Glu}$ se localiza principalmente en la capa plexiforme externa de la retina y presenta una cinética saturable con un solo componente ($K_B = 0.55 \mu\text{M}$ y $B_{\text{max}} = 15-22 \text{ pmolas/mg proteina}$), mientras que la de $^3\text{H-Asp}$ parece estar igualmente distribuida en ambas capas sinápticas y presenta una cinética con dos componentes en cada

FIGURA 6

CARACTERISTICAS CINETICAS DE LOS RECEPTORES PARA AAE

POLLOS ADULTOS



La unión específica de agonistas generales específicos (^3H -CPP, ^3H -AMPA y ^3H -KA) a los receptores de AAE muestra cinéticas saturables y de alta afinidad con un solo componente, en el caso de los agonistas a receptores de tipo NO-NMDA y con dos en el caso de la unión de ^3H -CPP.

fracción: uno de alta afinidad con una K_B de 12-40 nM y una B_{max} de 0.4-0.66 pmolas/mg proteína que se localiza en ambas fracciones, y otro de baja afinidad, con una K_B de 291 nM y $B_{max} = 4.8$ pmolas/mg proteína en la fracción P_1 y no saturable a una concentración de 1 μ M en la fracción P_2 .

En cuanto a la distribución de los receptores que unen 3H -Glu y 3H -Asp, encontramos que:

- Las células amacrinas y las bipolares "OFF" tienen la misma proporción de receptores para Glu y Asp.
- En las células horizontales, la proporción de receptores para Glu y para Asp es de 3:1.
- Las bipolares "ON" parecen tener únicamente receptores para Asp.
- Aproximadamente el 28% de los receptores para Glu y el 35% de los de Asp corresponden a receptores postsinápticos en las células ganglionares y receptores posiblemente presinápticos en los fotorreceptores.

b) Estudios con ligandos específicos:

En la retina de los pollos adultos coexisten los receptores NO-NMDA (QA y KA) y los NMDA (medidos con 3H -CPP):

- Receptores de QA: En la retina de pollos adultos se encontró que el 3H -AMPA se une a estos receptores con una cinética saturable y de alta afinidad ($K_B=1.69$ μ M y $B_{max}=9.85$ pmolas/mg proteína) con un sólo componente, tanto en la retina completa como en las fracciones subcelulares, con aproximadamente 50% de unión específica y una distribución semejante en las dos fracciones. También se estudió la capacidad para desplazar al

³H-AMPA de algunos análogos estructurales de estos aminoácidos y del ácido iboténico sintetizados por el grupo de Krogsgaard-Larsen (1984). Los desplazadores más potentes (con más del 90% de desplazamiento) del ³H-AMPA fueron el AMPA, el 7-HPCA, el L-Glu, el QA, el Quin y el 2,3,-PDA.

- Receptores de KA: Al medir la cinética de la unión de ³H-KA se encontró que es saturable en un orden de concentraciones entre 1 y 500 nM y presenta un sólo componente de alta afinidad, con una Bmax de 0.312 pmolas/mg proteína y una K_B de 19.5 nM.

- Receptores de NMDA: La unión específica de ³H-CPP muestra una cinética bifásica en presencia de MgCl₂ 1 mM (K_{B1} = 59 nM y Bmax₁ = 2.2 pmol/mg proteína; K_{B2} = 431 nM y Bmax₂ = 9.5 pmol/mg proteína). En ausencia de Mg⁺⁺ únicamente puede detectarse el sistema de baja afinidad con las mismas constantes cinéticas que en presencia de este catión. La farmacología permitió distinguir entre los dos sitios: el L-Asp desplaza al ³H-CPP únicamente del sitio de baja afinidad, mientras que los desplazadores más potentes del CPP unido a los sitios de alta afinidad son el AMPA y el APH.

En cuanto a la distribución de los distintos subtipos de receptores, por estudios electrofisiológicos Coleman y col. (1986) demostraron que las bipolares "ON" están enriquecidas en receptores de tipo APB, los receptores de tipo KA se localizan en las células horizontales, amacrinas, ganglionares y bipolares "OFF", y los de NMDA y QA en las células ganglionares y amacrinas.

2. RECEPTORES PRESINAPTICOS (AUTORRECEPTORES).

La liberación de la mayoría de los neurotransmisores puede

modularse a través de la interacción del transmisor liberado con receptores en la terminal presináptica (autorreceptores). Generalmente se ha observado que los neurotransmisores, tanto aquellos con efectos postsinápticos inhibitorios, como los considerados transmisores excitadores, al interactuar con los autorreceptores inhiben la liberación del transmisor. Esta inhibición presináptica se ha demostrado en el caso de la noradrenalina (Langen et al., 1979; Reichenbacher et al., 1982), la dopamina (Farnebo y Hamberger, 1971), el GABA (Mitchell y Martina, 1978; Arbilla et al., 1979), la acetilcolina (Szerb, 1964; Polak, 1971) y la serotonina (Cerrito y Raiteri, 1979a y b; Gothert, 1980), por estudios en los que se aplica el compuesto transmisor y se despolariza simultáneamente la terminal ya sea eléctricamente o utilizando altas concentraciones de KCl.

A pesar de que se desconoce el mecanismo por el cual la interacción de los transmisores con los autorreceptores puede inhibir la liberación, se ha propuesto que podrían actuar:

- hiperpolarizando la membrana, por ej. por estimulación de la ATPasa de Na⁺/K⁺ (Vizi, 1974),
- reduciendo la amplitud del potencial de acción (Vizi, 1979),
- disminuyendo la resistencia de la membrana (por ej. aumentando la conductancia), con lo cual la despolarización sería menos efectiva y se liberaría menos transmisor (Dudel y Kuffler, 1961),
- inactivando o bloqueando los canales de Ca⁺⁺ sensibles a voltaje (De Langen y Mulder, 1980; Gothert y Wehking, 1980),
- interfiriendo con el acoplamiento de la secreción (Starke, 1977; Langer, 1981), o bien
- aumentando los niveles de GMPc (Pelayo et al., 1977), o

disminuyendo los de AMPc (Wikberg, 1979).

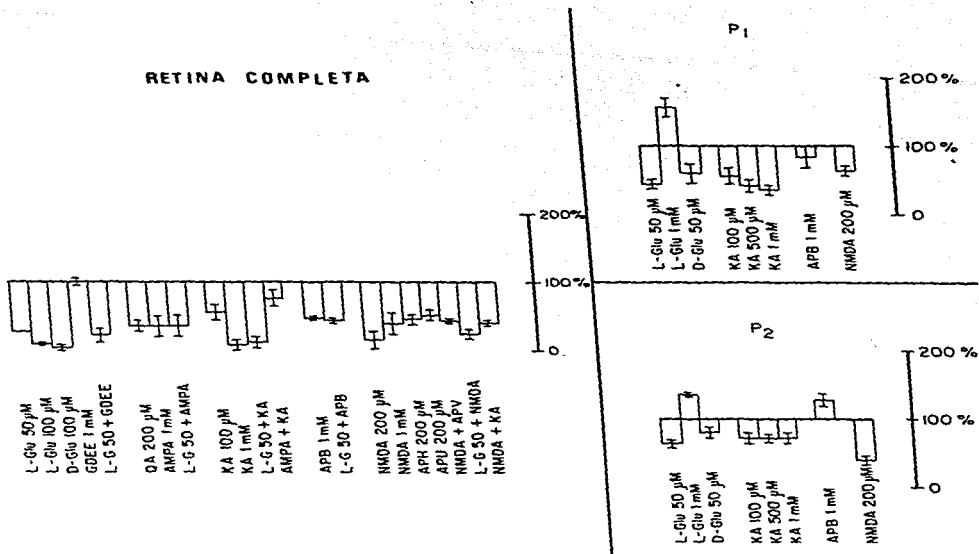
La existencia de receptores presinápticos para AAE se ha demostrado en algunas áreas del SNC, como el hipocampo (Ferkany et al., 1982; McBean y Roberts, 1981). En la retina de pollo, López Colomé y Roberts (1987) demostraron que tanto los agonistas como los antagonistas específicos de los distintos subtipos de receptores postsinápticos para AAE inhiben la liberación de ³H-D-Aspartato estimulada por despolarización con alto potasio, probablemente a través de su interacción con receptores presinápticos (Fig. 7). Las características farmacológicas de estos sitios difieren de aquellas de los sitios postsinápticos descritos anteriormente:

- Los antagonistas del receptor de tipo NMDA (APV y APH) actúan como agonistas parciales (con mayor afinidad y menor efectividad) revirtiendo parcialmente la inhibición por NMDA pero inhibiendo por sí mismos la liberación de ³H-D-Asp.
- No parece existir estereoespecificidad ya que tanto el L- como el D-glutamato, ya que a una concentración de 100 µM, ambos inhiben aproximadamente el 90% de la liberación.
- El NMDA y el KA no tienen un efecto aditivo, lo cual indicaría la interacción de ambos compuestos con un mismo receptor.
- El AMPA parece actuar como un agonista parcial en el receptor preferente para KA.

De estos estudios se puede concluir que los receptores presinápticos para AAE, al menos en la retina, presentan características farmacológicas distintas de las descritas para los receptores postsinápticos.

FIGURA 7

INHIBICION DE LA LIBERACION DE $^3\text{H-D-ASP}$ POR AAE



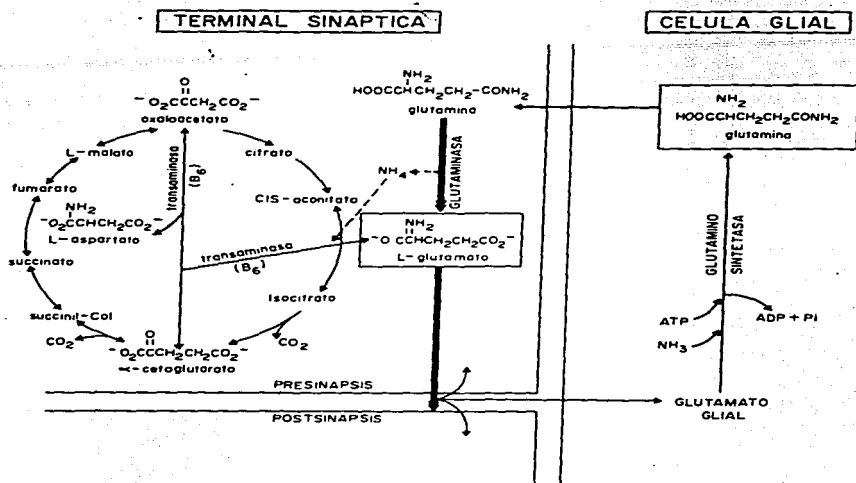
Los agonistas tanto de los receptores de NMDA como de los NO-NMDA inhiben la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ estimulada por alto K^+ (100% en la figura) en la retina completa de pollos adultos. En las fracciones subcelulares, particularmente en la P₁ (fracción nuclear), se observa un patrón muy similar al de la retina completa, y en la fracción P₂ (fracción sinaptosomal cruda) el NMDA tiene un efecto inhibitor más potente. Los resultados son el promedio de por lo menos 3 experimentos \pm S.E.M.

3. CAPTACION.

En cuanto a la captación de AAE en la retina de animales adultos, los estudios de Thomas y Redburn (1978) en retina de conejos y de White y Neal (1976) en retina de rata demuestran que existe un transportador común para Glu y Asp, que no presenta estereoespecificidad (lo cual permite utilizar al D-Asp como marcador, ya que no es metabolizado como los isómeros L) y que depende tanto de Na^+ como de energía. En cuanto a las poblaciones celulares que presentan este tipo de receptores, parece ser que aunque todos los tipos celulares de la retina son capaces de captar estos aminoácidos, son las células de Müller las que recaptan la mayor parte del glutamato liberado, lo metabolizan a glutamina (por medio de la enzima glutamino-sintetasa que se localiza principalmente en estas células) y liberan ésta, que a su vez es captada por las neuronas para formar nuevamente glutamato liberable (por la acción de la enzima mitocondrial glutaminasa I, que se localiza en las terminales nerviosas) (Herz, 1979) (Fig. 8). Recientemente se ha descrito también un sistema de captación electrogénica para AAE en las células de Muller de la retina del ajolote y en astrocitos de cerebro y se ha propuesto que la despolarización de las células gliales por los AAE podría deberse a este mecanismo (Brew y Attwell, 1987; Barbour et al., 1988).

FIGURA 8

INTERACCION NEURONA-GLIA EN EL METABOLISMO DEL GLUTAMATO



El glutamato liberado como neurotransmisor al espacio sináptico se recapta tanto por las terminales sinápticas como por las células gliales. En estas últimas, el glutamato se transforma en glutamina, que es liberada nuevamente al medio extracelular y captada por las neuronas. Esta glutamina, por acción de la glutaminasa en las terminales sinápticas, origina de nuevo ácido glutámico liberable ante un impulso nervioso.

(Tomado de López Colomé, A.M. En: Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas (Pasantes-Morales, H. y H. Aréchiga, Eds.), UNAM.

V. ONTOGENIA DE LOS RECEPTORES PARA AAE

1. ESTUDIOS EN EMBRIONES

A. RECEPTORES PARA AAE EN EL SNC DE EMBRIONES.

Durante la diferenciación celular, existe una correlación entre los cambios morfológicos y los cambios bioquímicos: así, en distintos momentos del desarrollo es posible detectar la actividad de distintas enzimas que incluso, en algunos casos, han llegado a considerarse como marcadores para ciertas etapas del proceso de diferenciación (Rosenberg, 1973). Recientemente, sin embargo, se ha visto que los cambios bioquímicos no se limitan a la aparición o desaparición de ciertas enzimas y vías metabólicas sino que existe una verdadera "maduración" desde el punto de vista bioquímico y que las proteínas cuya actividad comienza a detectarse en un momento dado modifican sus propiedades a lo largo de la diferenciación celular. En el Sistema Nervioso, se ha visto que los receptores sinápticos a distintos neurotransmisores, como por ej. el GABA (Stewart y Bourne, 1987) o la acetilcolina (Large et al., 1985) así como los canales iónicos asociados a estos receptores (Schuetze et al, 1978) no presentan las mismas características durante el desarrollo ontogenético que en los animales adultos. Asimismo, en la retina de pollo se ha demostrado que la captación de GABA aumenta a lo largo del desarrollo embrionario (Frederick, 1987), y que la liberación de acetilcolina se incrementa durante la ontogenia con una correlación temporal con la formación y maduración de las sinapsis colinérgicas en la retina (Thompson, 1982). Estas propiedades particulares de los receptores en momentos críticos

del desarrollo permiten suponer que los transmisores poseen funciones distintas a las de neurotransmisor clásico, una de las cuales podría ser un efecto trófico sobre las células con las que interactúan.

En cuanto a los receptores para AAE durante la ontogenia, se ha visto que, en general, las futuras células postsinápticas son sensibles a los AAE antes del establecimiento de las primeras sinapsis (Woodward et al., 1971); sin embargo, la sensibilidad a los agonistas de los AAE, que podría correlacionarse con la proporción relativa de los diferentes subtipos de receptores para AAE funcionales en determinado momento, varía significativamente durante el desarrollo ontogenético. Uno de los ejemplos más claros lo presenta el cerebelo de la rata, cuyo desarrollo es esencialmente postnatal, y en donde las células de Purkinje responden sólo a los agonistas generales al momento del nacimiento. La sensibilidad a estos agonistas generales aumenta después del nacimiento y alcanza un máximo entre los días 5 y 8; en cambio, la sensibilidad a los agonistas específicos no aparece sino hasta el día 10, momento a partir del cual el ácido quisquálico se vuelve el excitador más potente. En estas células, la sensibilidad al NMDA es temporal: aparece al principio de la sinaptogénesis y disminuye durante el primer mes hasta alcanzar los valores del adulto, que son muy bajos (Dupont et al., 1987). Otro ejemplo lo encontramos en el cuerpo estriado y en el hipocampo de rata, donde la potencia excitotóxica del QA y del KA se invierten durante el desarrollo: en los animales inmaduros, el QA es altamente neurotóxico y las células son

relativamente insensibles al ácido kaínico (Silverstein et al., 1986; Baudry et al., 1983), mientras que en los animales adultos sucede lo contrario. Los cambios en los receptores para AAE no se limitan a los receptores postsinápticos, sino que también se modifica la captación de estos aminoácidos como demostraron Schmidt y Wolf (1983) al encontrar un aumento en la acumulación de L-glutamato y D-aspartato durante el desarrollo del hipocampo.

B. RECEPTORES PARA AAE EN LA RETINA EMBRIONARIA.

En la retina embrionaria, la sensibilidad a los AAE, en particular a los ácidos kaínico y quinolínico, se ha estudiado únicamente desde el punto de vista de su efecto neurotóxico. En estos estudios se observó el efecto agudo de la exposición de las retinas aisladas a distintas concentraciones de AAE (en el orden milimolar para el ac. quinolínico y micromolar para el kainato). La sensibilidad al quinolinato aparece al día 9 DE y aumenta hasta el día 12 DE, afectando la capa nuclear interna de la retina (Gibson et al., 1985). La sensibilidad al KA (Gibson y Reif-Lehrer, 1984; De Nardis et al., 1988) aparece entre los días 7 y 8 DE en las células amacrinas y aumenta hasta el día 14, para después disminuir. Entre los días 8 y 10 DE se afectan también las células horizontales, sin embargo, su sensibilidad es baja comparada con la de las células amacrinas y no aumenta a lo largo del desarrollo. Las células bipolares no son sensibles a la acción neurotóxica del KA hasta el día 12 DE y alcanzan la máxima susceptibilidad al día 20 DE; sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con las células amacrinas, ésta no disminuye posteriormente (De Nardis et al., 1985).

2. ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES.

A. RECEPTORES PARA AAE EN CULTIVOS DE CELULAS DEL SNC.

Los cultivos de células disociadas de Sistema Nervioso presentan una serie de ventajas para el estudio de los procesos que intervienen en la diferenciación celular. Así, en los cultivos, puede modificarse el medio extracelular y observarse el efecto de hormonas, factores de crecimiento, etc. sobre esta diferenciación. Por otra parte, es posible obtener cultivos enriquecidos en algunos tipos celulares y en ellos determinar si la inducción de ciertas propiedades se debe a la influencia de otros tipos celulares o a factores intrínsecos.

La diferenciación de las células en cultivo se ha estudiado no sólo desde el punto de vista morfológico sino también neuroquímico; como ejemplos se puede citar la adquisición de selectividad farmacológica de los receptores para GABA y glicina en cultivos de neuronas del cerebelo (Mori-Okamoto y Tatsuno, 1985). En lo que respecta al estudio de los receptores para AAE, el uso de los cultivos ha permitido estudiar dos aspectos que hubiera sido muy difícil conocer en otro tipo de preparaciones: en primer lugar, las características electrofisiológicas de los canales asociados a los receptores, y en segundo lugar, el papel de los AAE como factores tróficos.

Por experimentos electrofisiológicos se han logrado caracterizar las corrientes iónicas provocadas por los agonistas de los receptores de NMDA y NO-NMDA en neuronas del hipocampo (Jahr y Stevens, 1987), del cerebelo (Cull-Candy y Usowicz, 1987) y de la médula espinal (Vlachova et al., 1987), y en astrocitos

de cerebro, (Bowman y Kimelberg, 1984) e incluso se ha llegado a demostrar que ambos tipos de receptores coexisten en la misma postsinapsis (Bekkers y Stevens, 1989). La funcionalidad de los receptores para AAE en los cultivos se ha demostrado también por otros métodos como por ejemplo la capacidad de los AAE para estimular la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ o de otros neurotransmisores como el GABA o la acetilcolina (Pin et al., 1988; Harris y Miller, 1989) o el efecto trófico que tienen los AAE para promover la supervivencia y la diferenciación celulares (Balazs et al, 1988) y para estimular o detener la extensión de neuritas, según el tipo celular de que se trate (Mattson et al., 1988; Brewer y Cotman, 1989).

Asimismo, en cultivo de células se ha demostrado no sólo la acción ionotrópica de los AAE sino también la producción de segundos mensajeros en respuesta a estos compuestos. Así, en cultivos de células granulares del cerebelo se han caracterizado los receptores metabotrópicos relacionados con la producción de GMPc (Novelli et al., 1987), de fosfatidil inositol (Nicoletti et al., 1987) y de ácido araquidónico (Lazarewicz et al., 1988). Por otra parte, también se han caracterizado los sistemas de captación de alta afinidad y liberación de AAE tanto en líneas celulares (neuroblastoma de ratón y glioma de rata) (Balcar et al., 1987), como en cultivos primarios de células granulares del cerebelo (Balcar et al., 1987; Drejer et al., 1983), de astrocitos, y de neuronas de la corteza cerebral (Drejer et al., 1983).

B. RECEPTORES PARA AAE EN CULTIVOS DE CELULAS DE LA RETINA.

En cuanto a los cultivos de células de retina, se ha

demostrado que las células ganglionares de la retina de rata presentan receptores de tipo NMDA que pueden mediar el efecto neurotóxico del glutámico cuando se elevan las concentraciones extracelulares de calcio (Hahn et al., 1988). En cultivos de retina de pollo se ha visto que el ácido glutámico, pero no el kaínico, inhibe la proliferación tanto de neuroblastos como de glioblastos. En el caso de las células de Müller, esto sucede únicamente en una etapa crítica (a los 3 DIV) después de la cual el ácido glutámico no tiene efecto (Hyndman, 1984), al contrario de lo que sucede con las neuronas de la corteza, cuya vulnerabilidad al ácido glutámico aumenta con la maduración (Choi, 1985; Wahl et al., 1989). En los cultivos de retina de pollo también se ha estudiado, por autorradiografía, la acumulación de AAE y se ha visto que aproximadamente el 30% de las células presentes en cultivos de neuronas y en prácticamente el 100% de las células de Müller captan al Glu con alta afinidad, de manera dependiente de Na^+ (Hyndman y Adler, 1982).

OBJETIVOS

El estudio farmacológico de los receptores para AAE en la retina de pollo durante la embriogénesis y en células retinianas en cultivo puede aportar evidencias importantes para implicar a los AAE en los procesos de diferenciación de distintos tipos celulares. Por este motivo, los objetivos de este trabajo fueron:

OBJETIVOS GENERALES:

1. Determinar en que momento del desarrollo ontogenético y de la diferenciación in vitro aparecen los diferentes tipos de receptores para AAE: receptores sinápticos, autorreceptores, y el sistema de captación de alta afinidad.
2. Determinar si los receptores para AAE sufren cambios en sus propiedades bioquímicas durante la diferenciación celular.
3. Determinar si existe un paralelo entre la diferenciación bioquímica de los receptores para AAE in vivo y en las células en cultivo, con el fin de establecer un modelo en el cual sea posible estudiar los factores que determinan esta diferenciación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar la aparición de la unión específica de $^3\text{H-Glu}$, $^3\text{H-Asp}$, $^3\text{H-KA}$, $^3\text{H-AMPA}$ y $^3\text{H-NMDA}$ en membranas aisladas de embriones de pollo de 7, 11, 14, 18 y 21 días de desarrollo embrionario.
2. Determinar las características cinéticas de la unión de estos ligandos y la capacidad de agonistas y antagonistas de los diferentes subtipos de receptores para AAE para desplazarlos.
3. Establecer los métodos para la obtención de cultivos de

células de la retina en los que predominen neuronas, o células de Müller.

4. En ambos tipos de cultivos, determinar la presencia de sitios de unión específica para $^3\text{H-Asp}$ y $^3\text{H-AMPA}$ a distintas edades de los cultivos: 1, 5, 8 y 12 DIV, así como las características cinéticas y farmacológicas de esta unión.

5. Determinar las características de la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ de retinas de embriones de pollo de 7, 11, 14, 18 y 21 días de DE, su estimulación por despolarización con alto K^+ , y su dependencia de Ca^{++} .

6. Determinar el efecto de agonistas y antagonistas de los diferentes subtipos de receptores para AAE sobre la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ estimulada por alto K^+ , en diferentes momentos del DE: 7, 11 y 14 días.

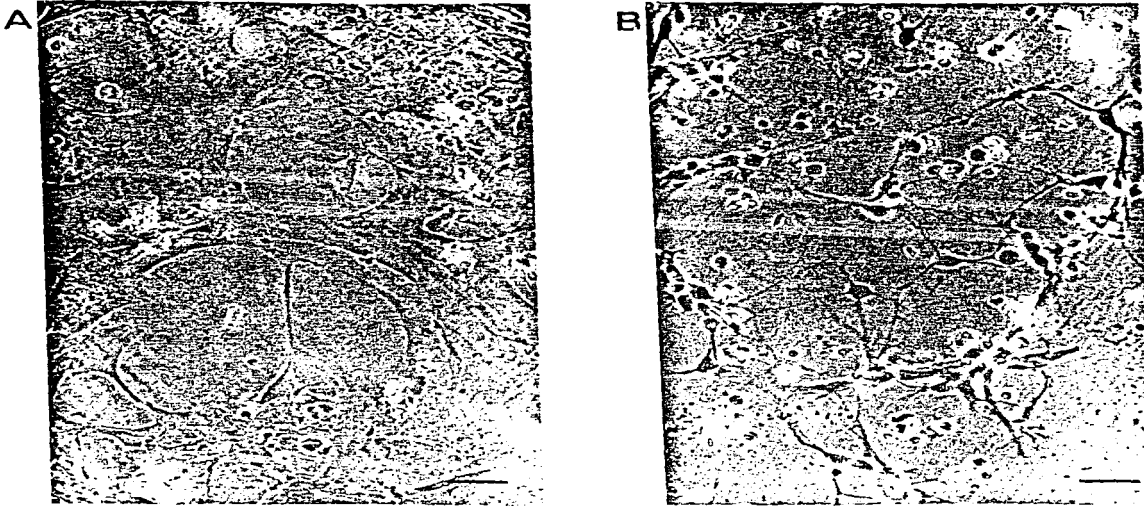
7. Determinar las características cinéticas y farmacológicas de la captación de $^3\text{H-D-Asp}$ en cultivos de neuronas o de células de Müller de distintas edades: 1, 5, 8 y 12 DIV.

MATERIAL Y METODOS

EMBRIONES. Se obtuvieron huevos fecundados de pollos de raza Barred Plymouth Rock (Armour Hatchery, S.A. de C.V.) y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 50% de humedad, en un incubador (Galván Hnos, S.A) con ciclos de movimiento cada hora.

CULTIVOS. Se utilizó la técnica descrita por Adler y col. (1982) para obtener cultivos de células disociadas de retina de pollo enriquecidos en neuronas o en células gliales de la siguiente manera: se disecaron las retinas de embriones de 7 días y se incubaron durante 30 minutos a 37°C con tripsina 0.25% en solución salina (CMF-Hanks BSS). Se detuvo la tripsinización por dilución con medio mínimo de Eagle (MEM) (Gibco) + 1% de albúmina y las células se disociaron mecánicamente con una pipeta Pasteur. La suspensión de células se pasó por una malla de 50 µm y se diluyó con MEM sin suero hasta obtener una concentración final de 1.5×10^6 células/ml para los cultivos de células gliales, o 1×10^6 células/ml, para los cultivos de neuronas. De esta suspensión se agregó 1 ml/caja de cultivo de 60 mm de diámetro (Nunc) a la que previamente se ha añadido 1 ml de MEM + 20% de suero fetal de bovino (FCS) (Gibco). Para los cultivos de neuronas se utilizaron cajas pretratadas con poli-D-lisina (0.1%) y FCS, y al 5º día in vitro (DIV) se les agregó citosín arabino furanosido 10^{-5} M y se incubó durante 24 hs. con el fin de eliminar las células en mitosis activa. Las cajas para los cultivos de células gliales no requieren ningún tratamiento especial. El aspecto de estos cultivos se muestra en la figura 9.

FIGURA 9
CULTIVOS PRIMARIOS DE RETINA DE POLLO



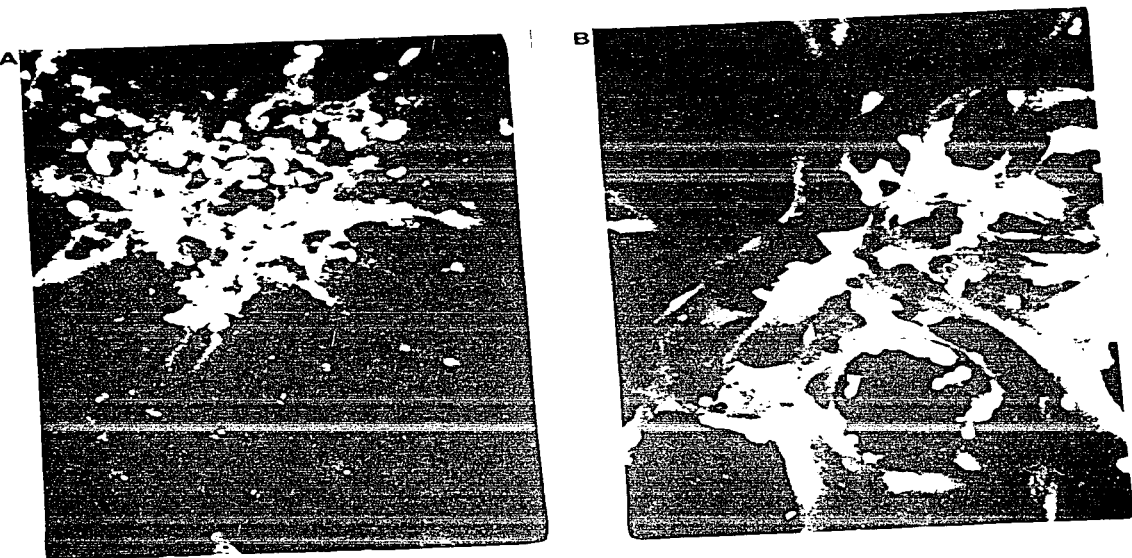
Las micrografías de contraste de fases muestran el aspecto de los cultivos enriquecidos en células gliales (A) o en neuronas (B) de la retina en su estado diferenciado: 12 DIV en el caso de la glía, y 5 DIV en el caso de las neuronas. Calibración: la barra en la parte inferior derecha representa 25 μm .

INMUNOCITOQUIMICA. Para determinar la pureza de los cultivos se detectó por técnicas inmunocitoquímicas, la presencia en ambos tipos de cultivo, de la proteína acídica fibrilar de la glía (GFAP), y la enolasa específica de neuronas (NSE); el aspecto de los cultivos de neuronas teñidos con el anticuerpo anti NSE y de los cultivos de células de Miller con el anticuerpo anti GFAP se muestra en la figura 10. Como un segundo control, se determinó la presencia de sitios de unión para toxina tetánica (TT), ya que existe evidencia de que la TT es un mejor marcador para las neuronas inmaduras que la NSE (Grothe y Unsicker, 1988).

En todos los casos, se aspiró el medio de cultivo con una pipeta Pasteur y se lavaron las cajas de cultivo 3 veces con solución amortiguadora Tris-acetatos 0.02M pH 7.4 + sacarosa 0.25 M + CaCl_2 1 mM + 5% FCS. Después se procedió de manera particular para los distintos marcadores:

GFAP: Las células se fijaron con metanol a -20°C durante 5 min., se lavaron 3 veces con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) + Tritón-X-100 (0.4%) y se incubaron 30 min con suero de cabra (3 mg proteína/ml) (Gibco). Después, se retiró el suero de cabra y se incubaron de 12 a 24 hs con el anticuerpo monoclonal contra la GFAP (ICN) (1:200 en PBS) a 4°C . Se lavaron con PBS y se incubaron 30 min. en cámara húmeda con suero de cabra anti inmunoglobulina G de ratón ($G \propto M$ IgG), acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) (1:20 en PBS). Se lavaron y se montaron en PBS:glicerol (1:9) para observarlas en un microscopio invertido (Nikon Diaphot-TMD) equipado con fluorescencia.

FIGURA 10
INMUNOCITOQUIMICA DE LOS CULTIVOS DE NEURONAS
Y CELULAS GLIALES DE LA RETINA



(A): Cultivos de neuronas de retina de 5 DIV teñidos con el anticuerpo policlonal de conejo contra la enolasa específica de neuronas y (B): cultivos de células de Muller de 8 DIV teñidos con el anticuerpo monoclonal contra la proteína fibrilar ácida de la glía. Aumento: 400 X.

NSE: Se utilizó el mismo procedimiento que para la GFAP, con distintos tiempos de incubación: primer anticuerpo, policlonal desarrollado en conejo (R^o NSE) (Dakopatts) (1:150 en PBS), 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente., y el segundo, suero de cabra anti inmunoglobulina G de conejo (G^o R IgG) acoplado a FITC (Sigma) (1:20 en PBS), 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Toxina tetánica (TT) (SSA, Lf/ml-40): Se incubaron las células con la TT (1:4 en Tris-acetato) durante 2 hs a 4°C. Se fijaron con formalina 1% en PBS durante 20 min. a 4°C y se incubaron con la antitoxina tetánica de caballo (SSA: 1000 UI/ml) (1:20 en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente. Después se incubaron con el segundo anticuerpo (anti IgG de caballo) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma) (1:100 en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente. La unión del segundo anticuerpo al primero se reveló con diaminobenzidina (0.8 mg/ml) + H₂O₂ (0.3%) durante 5 min. Entre cada paso se lavaron las cajas 3 veces con PBS. Se montaron en gelatina-glicerol, y se observaron en un microscopio invertido (Nikon Diaphot-TMD).

MEDICION DE RECEPTORES POSTSINAPTICOS PARA AAE:

A) En membranas aisladas. Se obtuvo una fracción membranal cruda a partir de la retina completa de embriones de pollo de 7, 8, 11, 14, 18 ó 21 días de DE, o de células cultivadas durante 1, 5, 8 ó 12 días. Esto se hizo por medio de choque osmótico empleando 20 volúmenes de agua bidestilada y centrifugación a 45000 x g durante 20 min. Las membranas se lavaron dos veces con agua bidestilada por el mismo procedimiento, y se congelaron en forma

de precipitado por lo menos durante 48 hs antes de realizar los ensayos. Para los ensayos se descongelaron las membranas y se resuspendieron en amortiguador Tris-HCl 0.1M pH 7.4 (excepto para los ensayos con ^3H -AMPA en los que se usó Tris-HCl 30mM pH 7.1 + CaCl_2 2.5 mM + KSCN 100 mM). De esta suspensión (0.8-1.0 mg de proteína/ ml) se tomaron alícuotas de 155 μl y se incubaron (por triplicado) con el ligando radioactivo (25 nM): ^3H -Glu (Amersham 48 Ci/mmol), ^3H -Asp (Amersham 19.1 Ci/mmol), ^3H -AMPA (NEN 27.6 Ci/mmol), ^3H -KA (NEN 60 Ci/mmol) o ^3H -NMDA (NEN 84.7 Ci/mmol), en presencia o ausencia de los distintos desplazadores (1 mM). La reacción se detuvo por centrifugación después de 10 min. de incubación. Los precipitados se lavaron superficialmente con agua a 4°C y se incubaron a temperatura ambiente de 12 a 24 hs en duodecil sulfato de sodio (SDS) al 2% . Después de este tiempo, se transfirieron a frascos y se les añadió 10 ml de Tritosol. La radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 1701).

B) En células completas. Se utilizó la técnica descrita por Richelson (1980) con algunas modificaciones. Se eliminó el medio de los cultivos de neuronas o células gliales de 1, 5, 8 y 12 DIV y las células se lavaron superficialmente con PBS. Se les agregó el amortiguador del ensayo (igual que en A) y se desprendieron las células con una espátula. De esta suspensión de células (0.4-0.8 mg de proteína/ml) se tomaron alícuotas de 155 μl que se incubaron durante 10 min en hielo con suficiente ligando radioactivo para obtener una concentración final de 25 nM, en presencia o ausencia de los desplazadores (1 mM). La reacción se

detuvo por filtración. Los filtros (Whatman GF/B) se lavaron con 10 ml del mismo amortiguador frío y se deshicieron mediante agitación en 10 ml de Tritosol. La radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 1701).

CARACTERIZACION DE RECEPTORES PRESINAPTICOS PARA AAE. Se midió la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ (Amersham, 26 Ci/mmol) estimulada por potasio de retinas completas de embriones de pollo de 7, 8, 11, 14, 18 y 21 días de DE y se estudió el efecto de los AAE sobre esta liberación. Los experimentos se hicieron de la siguiente manera: se disecaron las retinas y cada una se incubó por separado durante 15 min a 37°C con $1\ \mu\text{Ci}$ de $^3\text{H-D-Asp}$ en medio Krebs-bicarbonato. Se transfirieron a medio de Krebs a 4°C y se lavaron durante 1 min, después de lo cual se colocaron en cámaras de superfusión (1/2 retina/cámara). La superfusión se efectuó a un flujo de 1.5 ml/min, los primeros seis minutos con medio Krebs-bicarbonato normal (con KCl 4.7 mM), que al minuto 7 se reemplazó por Krebs con alto potasio (KCl 47 mM) + los AAE a concentraciones finales entre 50 μM y 1 mM. Se colectaron 15 fracciones de 1.5 ml y se determinó la radioactividad en cada una agregando 10 ml de Tritosol y contándolas en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 1701). Al terminar del experimento se digirieron las retinas incubándolas con SDS al 2% durante una hora a 60°C , y se determinó la cantidad de radioactividad que había quedado en el tejido.

CARACTERIZACION DE LA CAPTACION DE AAE. Se utilizaron cultivos de neuronas o células de Müller de 1, 5, 8 ó 12 DIV. Se eliminó el medio de cultivo, y las células se lavaron superficialmente

con PBS. Se les agregó 1 ml de medio Krebs-bicarbonato (o Tris-Krebs para los ensayos sin Na⁺) y se preincubaron 3 min a 37°C en un baño con agitación. Se les añadió 1 ml más de medio con suficiente ³H-D-Asp para obtener una concentración final de 250 nM (5 nM de radioactivo puro + 245 nM de frío) y se incubaron durante 10 min adicionales. Pasado este tiempo, se detuvo la reacción retirando el medio por aspiración y las células se lavaron 2 veces con Krebs-bicarbonato a 4°C. Para determinar la cantidad de ³H-D-Asp incorporada, se despegaron las células de las cajas con una espátula, se pasaron a frascos con 10 ml de Tritosol y se contaron en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 1701).

En todos los experimentos se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry et al. (1951), utilizando albúmina sérica de bovino (Sigma) como standard.

RESULTADOS

1. RECEPTORES SINAPTICOS PARA AAE.

a) Diferenciación in vivo. Los resultados aparecen en la publicación número 1 (p. 60):

Somohano, F., P.J. Roberts y A.M. López Colomé. (1988). Maturational changes in retinal excitatory amino acid receptors. Dev. Brain Res. 42: 59-67.

b) Diferenciación in vitro. Los resultados de la unión de $^3\text{H-Asp}$ y $^3\text{H-AMPA}$ a células de retina en cultivo se muestran en la p. 72.

2. RECEPTORES PRESINAPTICOS (AUTORRECEPTORES)

- Diferenciación in vivo. El efecto de los AAE sobre la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ estimulada por despolarización se muestra en la p. 83.

3. CAPTACION.

- Diferenciación in vitro. Los resultados aparecen en la publicación número 2 (p. 90):

Somohano, F. y A.M. López Colomé. Characteristics of excitatory amino acid uptake in cultures from neurons and glia from the retina. J. Neurosci. Res. (enviado a publicación).

I.a. RECEPTORES SINAPTICOS. Diferenciación in vivo

Ontogenia de los receptores para AAE

Se determinó la curva de aparición de la unión específica de $^3\text{H-Glu}$ y $^3\text{H-Asp}$ como agonistas de todos los subtipos de receptores para AAE, y $^3\text{H-AMPA}$, $^3\text{H-NMDA}$ y $^3\text{H-KA}$ como marcadores específicos de los distintos subtipos de receptores (QA, NMDA y KA, respectivamente), en membranas aisladas de retinas de embriones de pollo de 7, 8, 11, 14, 18 y 21 días de desarrollo.

Como se observa en la figura 1 (de la publicación #1), la unión de $^3\text{H-Glu}$ y $^3\text{H-Asp}$ se mantiene en valores muy bajos (aproximadamente 0.07 pmolas/mg proteína) al principio del DE. Entre los días 11 y 14 DE, la unión específica de $^3\text{H-Glu}$ aumenta hasta alcanzar los valores del adulto (0.3 pmolas/mg proteína). El aumento en la unión específica de $^3\text{H-Asp}$, sin embargo, no se observa hasta las etapas tardías del DE, entre los días 14 y 18.

La unión de los distintos agonistas específicos varía también durante el desarrollo ontogenético:

- la unión específica de $^3\text{H-AMPA}$ aparece en etapas muy tempranas alcanzando, a los 7 días DE, valores de 1.0 ± 0.2 pmol/mg proteína. Este valor disminuye drásticamente entre los días 7 y 10 DE, en donde alcanzan los valores del adulto (0.3 pmol/mg proteína).
- la unión específica de $^3\text{H-NMDA}$ sigue un curso temporal similar al del $^3\text{H-Asp}$ aunque posterior, ya que empieza a aumentar a los 18 días DE, alcanzando a los 21 días los niveles del adulto. Puesto que ambos compuestos interactúan con el mismo subtipo de receptores para AAE, el desfase de las curvas puede deberse

a un cambio en la especificidad farmacológica del receptor, como se observa en la Tabla III (de la publicación #1).

- Los sitios de unión específica para $^3\text{H-KA}$ se detectaron únicamente después de la eclosión, con valores similares a los del adulto.

Características cinéticas de la unión específica de los AAE durante el desarrollo ontogenético.

Las figuras 2, 3, 4, 5 y 6 (de la publicación #1) muestran las curvas de saturación y los análisis de Scatchard de la unión específica de $^3\text{H-Glu}$, $^3\text{H-Asp}$, $^3\text{H-AMPA}$ y $^3\text{H-KA}$ en momentos del desarrollo en que sus valores son más altos: 11 en el caso del Glu; 18, en el del Asp; 7 y 8, en el del AMPA y un día después de la eclosión, en el caso del KA. En todos los casos se obtuvieron cinéticas saturables, de alta afinidad, y con constantes iguales a las del adulto en el caso del Glu, del Asp y del KA. En el caso de la cinética del $^3\text{H-AMPA}$, sin embargo, se observó un cambio tanto en el número como en la afinidad de los receptores entre los días 7 y 8 DE ($K_B = 0.56 \mu\text{M}$ y $B_{\text{max}} = 14.4 \text{ pmol/mg}$ proteína a los 7 DE, y $K_B = 2.02 \mu\text{M}$ y $B_{\text{max}} = 37 \text{ pmol/mg}$ proteína a los 8 DE).

Farmacología de la unión específica de los AAE durante el DE.

Las Tablas I, II y III (de la publicación #1) muestran la farmacología de la unión específica de $^3\text{H-AMPA}$, $^3\text{H-Glu}$ y $^3\text{H-Asp}$, respectivamente, en distintos momentos del DE. En todos los casos se observa un aumento en la especificidad farmacológica, aunque esto es más evidente en el caso de los agonistas generales ($^3\text{H-Glu}$ y $^3\text{H-Asp}$).

Discusión

Los resultados muestran que los receptores que unen Glu, Asp, KA, NMDA y AMPA aparecen en distintos momentos del DE en la retina de pollo. Esto apoya la idea de que estos compuestos interactúan con diferentes subtipos de receptores para AAE. A lo largo del desarrollo ontogenético, los receptores que unen Glu, Asp y AMPA adquieren especificidad farmacológica y, en el caso del AMPA, también las características cinéticas del receptor del adulto. Estos cambios podrían estar relacionados con a) la diferenciación de tipos celulares específicos; b) el establecimiento de contactos sinápticos en la retina, o c) el acoplamiento en la membrana con otras proteínas que pudieran restringir la configuración de los receptores, o bien con aquellas relacionadas con la producción de segundos mensajeros.

Maturational changes in retinal excitatory amino acid receptors

Frida Somohano¹, Peter J. Roberts² and Ana María López-Colomé¹

¹Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (Mexico) and ²Department of Physiology and Pharmacology, University of Southampton, Southampton (U.K.)

(Accepted 23 February 1988)

Key words: Retina; Excitatory amino acid; Receptor maturation chick embryo

The appearance, kinetics and pharmacological properties of receptors for *n*-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA), kainate (KA), L-glutamate (Glu) and L-aspartate (Asp) was investigated using ³H-ligand binding during the development of chick embryo retina. Receptors for AMPA are maximally concentrated at embryonic day 7 (ED 7) and decline 50% in subsequent days; L-Glu receptors are low until ED 11, and the same is true for Asp and NMDA receptors which increase at ED 14 and 18 respectively. All receptors studied underwent an increase in pharmacological specificity, whereas only AMPA-receptors showed an important change in affinity during ontogeny. Results demonstrate that receptors for excitatory amino acids in the retina suffer maturational changes and suggest that while NMDA and aspartate could interact with the same receptor, AMPA and glutamate seem to bind to different sites.

INTRODUCTION

The excitatory amino acids glutamate (Glu) and aspartate (Asp) as well as some related analogues have been proposed as putative transmitters at the vertical pathways in the vertebrate retina^{37,41}, some of them having, additionally, neurotoxic actions in this organ similar to other regions of the CNS^{18,29,40}. A general approach for demonstrating this role has been the biochemical and electrophysiological characterization of specific synaptic receptors for these compounds. The existence of at least 4 types of excitatory amino acid receptors in the CNS has been generally accepted: the quisqualate type (QA) which has quisqualate and α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) as the most specific agonists and glutamate diethyl ester (GDEE) as antagonist; the *N*-methyl-D-aspartate type (NMDA), for which NMDA is the most potent agonist while 2-amino-5-aminophosphonovaleric (APV) and 2-amino-7-phosphonoheptanoic (APH) acids are specific antagonists; the kainate type (KA) which has

domoate as agonist and γ -D-glutamylglycine, γ -D-glutamylaminomethyl sulphionate and 2,3-piperidine dicarboxylic acid as antagonists^{9,11,50}. The fourth type corresponds to receptors which are evident in the presence of chloride and are stimulated by calcium, for which the most specific agonist is 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB)¹¹.

In the retina, the transmitter from photoreceptors to horizontal and bipolar cells is apparently of the excitatory amino acid type. Evidence on this subject is mainly physiological: at the outer plexiform layer, L-glu, KA and QA mimic the effect of the natural transmitter hyperpolarizing On bipolars and depolarizing Off bipolars and horizontal cells in various species^{22,24,25,45,46}, although in some cases the effect of QA and KA is not consistently antagonized by GDEE and γ -D-glutamylglycine respectively^{42,43}. At the inner plexiform layer, amacrine cells seem to possess QA as well as NMDA receptors, while ganglion cells are excited by KA, NMDA and QA³⁶. Studies which have biochemically characterized postsynaptic receptors for excitatory amino acids in the retina

Correspondence: A.M. López-Colomé, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F., México.

0165-3806/88/003.50 © 1988 Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)

have demonstrated the presence of the main 4 types of excitatory amino acid receptors described and suggested that these receptors could be equivalent to those in the CNS, and consequently the retina could be used as a more accessible model for studying their molecular mechanisms^{8,19,26,28,30,38,39}. Recently, however, reports which suggest a possible interaction of NMDA and KA at the same receptor²⁴ have raised some doubts about such equivalence⁴. In spite of the evidence, a precise characterization of the excitatory amino acid receptor subtypes and the establishment of a definite neurotransmitter role for these compounds has been hampered by the lack of specificity of agonists and mainly of antagonists for these compounds⁵⁰.

Na⁺- and temperature-independent binding to synaptic membranes, which is also reversible and saturable has been considered as an interaction with postsynaptic receptors²⁶. In this study we have analyzed the binding of radioactive analogues which act at NMDA (³H]NMDA), QA (³H]AMPA) and KA (³H]KA) receptors, as well as that of (³H]L-Glu and (³H]L-Asp at progressive stages of embryonic development of the chick retina in order to determine if excitatory amino acid receptor types appear at the same or at different stages and at which particular stage each of these receptors acquires the pharmacological and kinetic specificity characteristic of the adult. These findings in turn could be of help in the characterization and purification of a particular form of receptor, and for clearing-up the possible trophic developmental influences among the components of the excitatory amino acid transmitter system — uptake, release and synaptic receptors — in the vertebrate retina.

MATERIALS AND METHODS

Eggs from local strain chicks were obtained from the University Animal House and placed in a humid incubator with air circulation at 37 °C until the desired embryonic age. Retinas from embryonic ages 7, 8, 11, 14, 18, 21 and posthatching days 1–5 were excised and membranes were obtained as previously described²⁶. Retinas were homogenized in a glass/glass homogenizer in 20 vols. (w/v) of double-distilled water and allowed to stand on ice for 15 min for a complete osmotic shock. Homogenate was centri-

fuged at 45,000 g for 20 min at 4 °C and washed twice using the same procedure. Pellets were frozen at -10 °C for at least 48 h ahead of the receptor binding assay.

Receptor binding assay

Membranes were resuspended in Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, to a protein concentration of 50 µg protein per assay. Membrane protein was incubated with the radioactive ligand: (³H]NMDA, (³H]L-Glu, (³H]L-Asp or (³H]KA at 25 nM concentration or with (³H]AMPA at 50 nM in the absence (control) or presence of 1 mM of the correspondent cold compound, to a final volume of 175 µl. After a 10-min incubation, the reaction was stopped by centrifugation in a Beckman Airfuge at 90,000 rpm for 2 min. Pellets were superficially rinsed with cold water, resuspended in 0.2 ml of 2% SDS (sodium dodecyl sulfate) and digested on a hot plate overnight. After the addition of 5 ml of Tritosol⁵³ to each sample, radioactivity was measured in a Packard liquid scintillation counter, and

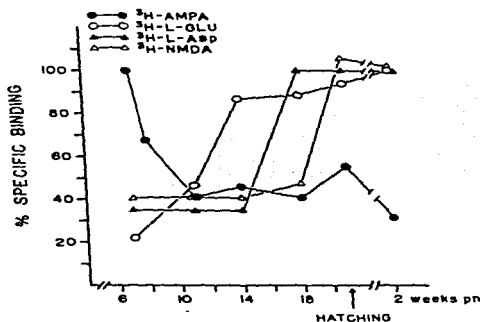


Fig. 1. Ontogeny of binding sites for (³H]AMPA, (³H]L-Glu, (³H]L-Asp and (³H]NMDA in chick retinal membranes. At the indicated ages, retinas were excised and membranes were prepared as described in Methods. Membranes were incubated with 25 nM of the ³H-ligand or 50 nM (³H]AMPA in the absence (control) or presence of 1 mM concentration of the cold compound; specific binding was calculated by subtracting non-specific from total binding. Data are expressed as % of the maximum binding of the same compound. Each point represents the mean of 4 series of experiments which varied less than 10% performed in triplicate.

values were corrected for quenching and counting efficiency. [^3H]AMPA binding was always performed in the presence of 100 mM KSCN and 2.5 mM CaCl_2^{30} . Controls for other ligands in this condition yielded the same values as in Tris-HCl alone (not shown).

Values for specific binding were obtained by subtracting the radioactivity values obtained in samples incubated in the presence of cold displacers from the total radioactivity in the absence of these compounds. All experiments were performed in triplicate. Curves were computer-analyzed by linear regression³¹.

Materials

[^3H]AMPA (spec. act. 25 Ci/mmol), [^3H]NMDA (spec. act. 84.7 Ci/mmol and vinylidene [^3H]KA (60 Ci/mmol) were from New England Nuclear, Boston, MA, U.S.A. [^3H]L-Glu and [^3H]L-Asp were from Amersham Searle, Buckinghamshire, U.K. Specific excitatory amino acid analogues were from Tocris-Neuramin, Essex, U.K. All common reagents and drugs were from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.

RESULTS

Ontogeny of excitatory amino acid receptors

[^3H]AMPA binding was present in the retina since the earliest developmental stage assayed (day 7),

reaching values of 1.0 ± 0.2 pmol/mg protein, which sharply declined at day 8 to 0.69 ± 0.1 pmol/mg protein, from which it slowly decreased to adult values (0.32 pmol/mg protein) as can be seen in Fig. 1.

[^3H]L-Glu binding was extremely low (0.07 pmol/mg protein) until days 11–14 (0.28 pmol/mg protein) in which it nearly reaches the adult values (0.32 pmol/mg protein).

The binding of [^3H]Asp and [^3H]NMDA follows a similar time course, being practically non-existent until days 14–18 at which values are comparable to those in the adult. NMDA binding is slightly delayed regarding L-Asp, as can be observed in Fig. 1, which could be due to a change in the specificity of the receptor as shown in Table III.

[^3H]Kainate binding was not observed until 24 h posthatching.

Kinetic properties of excitatory amino acid receptors

In order to establish if Glu binding appeared at embryonic day 11 (ED 11), with the same characteristics we have determined previously for adult retina²⁶, specific binding was measured within a [^3H]Glu concentration of 25–2000 nM. Binding was found saturable, with a B_{max} = 0.508 μM , as can be seen in the direct saturation curve (Fig. 2) and Scatchard analysis (Fig. 3). [^3H]Aspartate kinetics was studied for the same purposes at ED 18 and, as can be seen in Fig. 2, the saturation curve in the same concentration range as glutamate showed two components when

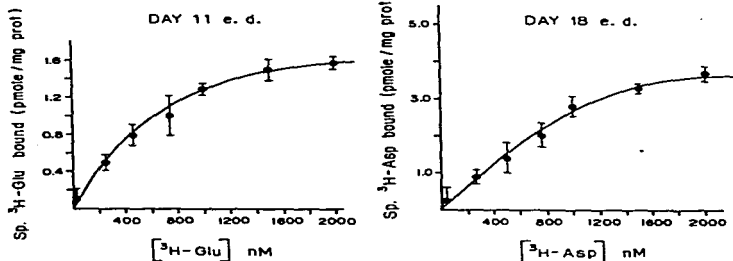


Fig. 2. Saturation curve of specific [^3H]Glu and [^3H]Asp binding at appearance day. Membranes were prepared and binding assay was conducted as described in Methods. Both ligands were tested in a concentration range of 2–2000 nM. Each point represents the mean \pm S.E.M. of 4–6 separate determinations performed in triplicate.

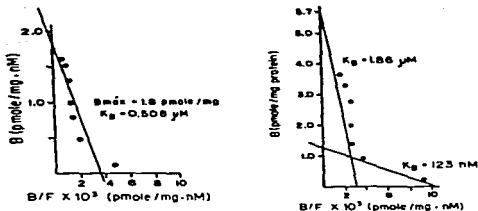


Fig. 3. Scatchard plots of specific [^3H]Glu and [^3H]Asp binding at ED 11 and ED 18 respectively. The curve on the left is for Glu and the one on the right for Asp. The data were calculated from values obtained for the saturation curves shown in Fig. 2.

Scatchard analysis was performed: a high affinity system $K_B = 123 \text{ nM}$ with $B_{\text{max}} = 1.3 \text{ pmol/mg}$ protein, and a lower affinity component $K_B = 1.86 \text{ } \mu\text{M}$ and $B_{\text{max}} = 10.5 \text{ pmol/mg}$ protein (Fig. 3). In both cases these values are in the same range as those obtained for the same ligand in adult chick retina²⁸.

A saturation curve for [^3H]AMPA at ED 7, in a concentration range from 25 nM to 2.0 μM , showed a

high affinity system with $K_B = 0.56 \text{ } \mu\text{M}$ and $B_{\text{max}} = 14.4 \text{ pmol/mg}$ protein (Fig. 4), these values being similar to those obtained for [^3H]L-Glu binding in the same species²⁶. Since a decrease in AMPA receptor binding was observed between days 7 and 8, we also performed a saturation curve at this stage. Analysis of the data indicated a change in affinity, which becomes 4 times lower ($K_B = 2.02 \text{ } \mu\text{M}$), together with an increase in B_{max} (37 pmol/mg protein), as shown in Fig. 5.

Since specific binding of [^3H]KA was not detected until 24 h posthatching; kinetic characteristics of the interaction were determined at 24–48 h of postnatal life in a concentration range of 2.5–400 nM. A single binding system was found showing $K_B = 20 \text{ nM}$ and $B_{\text{max}} = 0.375 \text{ pmol/mg}$ protein. Since these values are in agreement with our own (unpublished data) and others' findings in the adult chick retina³ and different brain regions⁴⁹ (Fig. 6), we rule out the possibility of any methodological problem in our assay conditions obscuring binding previous to this age.

Pharmacology of excitatory amino acid binding
AMPA binding. As can be observed in Table 1,

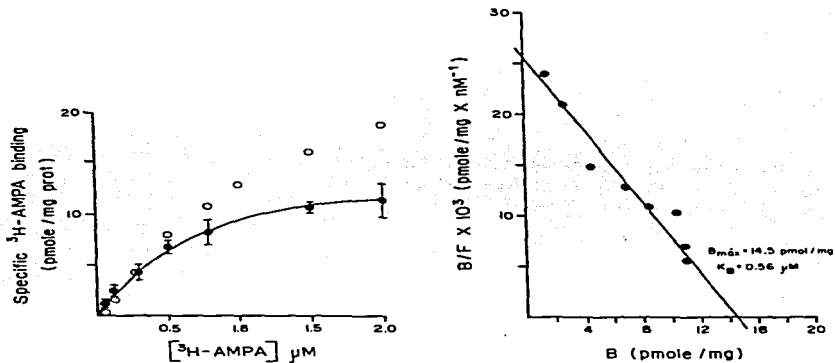


Fig. 4. Saturation curve and Scatchard analysis of specific [^3H]AMPA binding at ED 7. Experiments were performed as described in Methods and Fig. 1. The concentration range was 25 nM to 2.0 μM ; buffer contained 100 mM KSCN. Values for the saturation curve (left) and Scatchard analysis (right) at ED 7 are expressed as the mean \pm S.E.M. of 6 experiments performed in triplicate (\bullet). Saturation curve at ED 8 (\circ) is the mean of two independent experiments performed in triplicate.

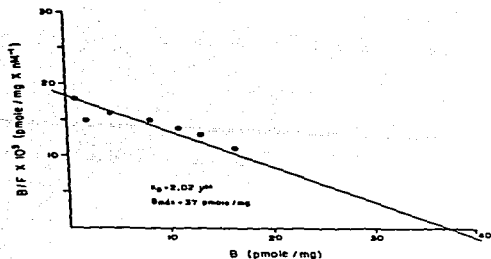


Fig. 5. Scatchard plot of the specific binding of $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ at ED 8. Data are the mean of two independent experiments which varied less than 10%, performed in triplicate.

$[^3\text{H}]\text{AMPA}$ binding shows little change in pharmacological specificity from ED 7 up to hatching; the same properties remain in posthatched retina³⁰, except for a decrease in the capacity of L-Asp and APB for displacing AMPA. The most effective displacers were L-Glu, OA and KA, while APV and NMDA had very weak displacing effects.

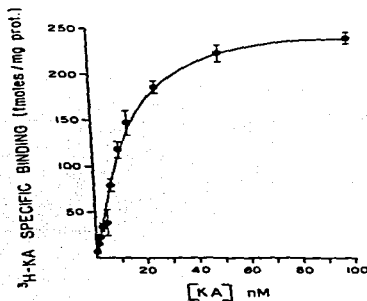


Fig. 6. Saturation curve and Scatchard analysis of the specific binding of $[^3\text{H}]\text{kainate}$ at 24 h posthatching. The concentration range used was from 2.5 to 400 nM. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of 6 independent experiments performed in triplicate. Binding assay was carried out as described in Fig. 1.

L-Glu binding. $[^3\text{H}]\text{Glu}$ binding when first apparent (ED 11) shows little specificity which increases with age. Since ED 14 a series of analogues for the 'glutamate-type' receptors readily displaced bound L-Glu (Table II); however, neither AMPA nor APV or KA do so, which is in agreement with previous reports in the retina of posthatched chicks²⁶. Displacement of L-Glu by APB, NMDA and D-Glu decreases 50% from day 14 to day of hatching.

L-Asp binding. $[^3\text{H}]\text{Asp}$ binding is observed only after ED 14, at which time APB is the most potent displacer. The specificity of the receptor seems to increase gradually with development, acquiring the typical pharmacology of NMDA receptors at day 21, with APV and α -amino adipate (α -AA) as the most effective displacers (Table III).

DISCUSSION

The time of appearance of excitatory amino acid receptors in the CNS has been studied mainly in mammals such as the rat^{2,10}, and in some cases an increase in receptors has been detected parallel to the establishment of synaptic contacts^{44,47}. Regarding retinal receptors for these compounds, their pres-

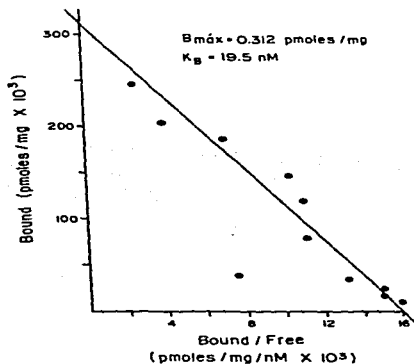


TABLE I

Displacement of [3 H]AMPA binding by analogues during development

Data represent the mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments performed in triplicate. Membrane preparation and binding assay are described in Methods. Incubation buffer contained 100 mM KSCN. ED, embryonic days.

Analogue (1 mM)	Specific displacement (pmol/mg protein)				
	7 ED	11 ED	14 ED	18 ED	21 ED
L-Glu	1.66 \pm 0.2	0.41 \pm 0.03	0.46 \pm 0.05	0.41 \pm 0.03	0.56 \pm 0.05
D-Glu	1.44 \pm 0.3	0.42 \pm 0.02	0.49 \pm 0.04	0.39 \pm 0.04	0.55 \pm 0.04
QA	1.84 \pm 0.2	0.58 \pm 0.04	0.44 \pm 0.02	0.34 \pm 0.04	0.51 \pm 0.05
KA	1.95 \pm 0.28	0.54 \pm 0.02	0.46 \pm 0.02	0.39 \pm 0.01	0.63 \pm 0.04
L-Asp	2.1 \pm 0.28	0.48 \pm 0.05	0.47 \pm 0.04	0.42 \pm 0.02	0.38 \pm 0.05
APB	2.17 \pm 0.22	0.51 \pm 0.02	0.58 \pm 0.03	0.42 \pm 0.01	0.41 \pm 0.06
APV	0.268 \pm 0.006	0.088 \pm 0.006	0.106 \pm 0.002	0.210 \pm 0.01	0.194 \pm 0.02
NMDA	0.259 \pm 0.012	0.067 \pm 0.005	0.073 \pm 0.04	0.194 \pm 0.02	0.140 \pm 0.002

ence has been mainly inferred through the excitotoxic lesions produced by compounds such as kainate and quinolinate in an 'in ovo' system^{15,16}. Studies regarding the action of these drugs in which the extent of the lesions has been directly correlated to the presence of receptors, have also been performed in tissue cultures of glia and neurons from chick retina^{15,21}. The present study in which synaptic receptors have been identified through the direct binding of specific radioligands, shows that receptors for glutamate, aspartate, KA, NMDA and AMPA/QA appear at different states of embryonic development of the chick retina, supporting the assumption that each of these

compounds interacts with a different type of excitatory amino acid receptor.

Our results regarding KA receptors demonstrate the absence of kainate binding at any stage of embryonic development in the retina, which is in agreement with results from Hyndman²¹ who has demonstrated that developing neurons from chick retina in culture are not altered by KA, whereas they are severely affected by the presence of μ M concentrations of L-Glu. Also, in other areas of the CNS such as cerebral cortex⁶ and cerebellum¹⁴, while immature brain is insensitive to the compound, neurotoxic activity is present in the adult. However, KA-induced

TABLE II

Displacement of [3 H]L-Glu binding by structurally related compounds

Absence of displacement is indicated by (-), n.d., not determined. ED, embryonic days. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of 4-6 series of experiments performed in triplicate. Membranes were incubated with 25 nM [3 H]L-Glu in the absence (control) or the presence of drugs at 1 mM concentration. Specific displacement was obtained by subtracting binding in the presence of analogues from total binding.

Compound (1 mM)	Specific displacement (pmol/mg protein)			
	11 ED	14 ED	18 ED	21 ED
L-Glu	0.072 \pm 0.002	0.364 \pm 0.13	0.304 \pm 0.080	0.368 \pm 0.080
D-Glu	0.050 \pm 0.001	0.360 \pm 0.016	0.260 \pm 0.012	0.180 \pm 0.016
L-Asp	0.080 \pm 0.031	0.048 \pm 0.012	0.289 \pm 0.018	0.257 \pm 0.003
KA	-	-	0.040 \pm 0.004	0.058 \pm 0.002
QA	n.d.	n.d.	0.246 \pm 0.011	0.166 \pm 0.001
GDEE	0.033 \pm 0.005	0.220 \pm 0.068	0.238 \pm 0.016	0.225 \pm 0.055
NMDA	0.020 \pm 0.002	0.128 \pm 0.001	0.196 \pm 0.004	0.074 \pm 0.045
α -AA	0.010 \pm 0.001	0.260 \pm 0.040	0.249 \pm 0.012	0.264 \pm 0.029
APV	0.066 \pm 0.002	-	0.055 \pm 0.004	-
APB	0.053 \pm 0.004	0.280 \pm 0.011	0.145 \pm 0.002	0.144 \pm 0.001
AMPA	-	-	-	-

TABLE III

Displacement of [^3H]L-Asp binding by structurally related compounds at 1 mM concentration

Data are the mean \pm S.E.M. of 4–6 independent series of experiments performed in triplicate. No displacement is indicated by (-). ED, embryonic days.

Compound (1 mM)	Specific displacement (pmol/mg protein)		
	14 ED	18 ED	21 ED
L-Asp	0.055 \pm 0.011	0.122 \pm 0.019	0.261 \pm 0.030
D-Asp	0.062 \pm 0.011	0.141 \pm 0.014	0.210 \pm 0.028
L-Glu	-	0.147 \pm 0.012	0.233 \pm 0.033
KA	-	-	-
QA	-	0.133 \pm 0.014	0.131 \pm 0.020
NMDA	0.043 \pm 0.001	0.081 \pm 0.011	0.184 \pm 0.034
α -AA	0.084 \pm 0.016	0.100 \pm 0.016	0.290 \pm 0.012
APV	-	0.106 \pm 0.010	0.344 \pm 0.002
APB	0.173 \pm 0.016	0.134 \pm 0.011	0.156 \pm 0.022

damage to ganglion cells and to the inner plexiform layer have been reported in chick retina as early as ED 6–8⁵. Since KA has been shown to act as a depolarizing agent⁴⁸, the toxicity observed in these cases could be due to the depolarization-induced release of L-Glu or some related compound which in turn could act as a toxic agent, since we here demonstrate that receptors of the glutamate-type are present since ED 7 (Fig. 1).

An increase in L-Glu receptors is observed at ED 11–14, ahead of those for aspartate. It is interesting to notice that according to the morphological development of differentiated structures in the retina, [^3H]Glu binding becomes evident at the time coated vesicles, which are precursors of synaptic vesicles appear at the inner plexiform layer (ED 11–12)¹⁷.

AMPA receptors are present at ED 7 (Fig. 1), showing a single high affinity component ($K_B = 0.56 \mu\text{M}$). The important decrease in affinity observed at ED 8 toward the value reported for the newborn³⁰ (2 μM), suggests a maturational change in the receptor. From the pharmacological point of view, the specificity of AMPA receptors increases only until ED 11, in which the capacity of APB to displace AMPA is decreased (Table I). At this stage, L-Glu and AMPA binding show similar properties, glutamate receptors acquiring stereospecificity later on (Table II). Neither APV nor AMPA or KA displace L-Glu during the whole span of embryonic development, while they do displace bound AMPA in agreement with

previous observations^{20,30}; this suggests that both ligands interact with separate receptors⁴⁷, although it does not rule out the possibility of a common origin for both sites.

Receptors which bind [^3H]Asp appear later in development (Fig. 1), in temporal correlation with the establishment of synaptic activity at the inner plexiform layer (ED 13), while the maximum increase in binding parallels the time at which two classes of morphologically different bipolars can be identified (ED 14)¹⁷, suggesting the participation of Asp as a transmitter at this level. Although receptors show typical Asp-pharmacology since detectable (Table III), the displacing capacity of APV, α -AA and NMDA increases approximately 4-fold from ED 14 to ED 21. Ontogeny of NMDA binding sites follows closely that of L-Asp, although delayed to ED 18–21, concomitant to the increase in pharmacological specificity of Asp-receptors towards NMDA-related analogues (Table III). These results seem to support binding of both ligands to a common site which undergoes developmental changes in specificity.

Receptors for L-Glu, L-Asp and AMPA acquire specificity during development, and in the case of AMPA, kinetic characteristics of the adult as well. These changes could be related to: (1) final differentiation of specific cell types; (2) onset of synaptogenesis, or (3) the acquisition of links with specific membrane systems related either to the restriction of configuration or to specific transduction systems.

As for the first possibility, the high concentration of AMPA receptors early in development, and the following decrease in affinity, could reflect a population of undifferentiated receptors giving rise to more specific subtypes, due to the development of synaptic specificity among cells which comes about after ED 7¹⁷. For the Asp- and Glu-receptors this does not seem to be the case, since all cell types are clearly distinguishable when these appear¹⁷.

As for the second possibility, it is tempting to correlate the presence of active synapses at ED 13 with the observed increase in Glu-receptors, as has been suggested for hippocampal receptors². However, it has been reported that GABA_A³¹ and muscarinic receptors in the retina²³ as well as Glu- and KA-receptors in the cerebellum^{10,47,52} precede synaptic formation. Since our findings indicate that the same is true for AMPA binding sites in the retina, we assume that

the mature characteristics of these structures are not directly related to the onset of functional synapses, but possibly to functional commitment of pre- and postsynaptic cells to a particular mode of transmission⁷. Alternatively, since presynaptic retinal receptors for Glu have been described²⁷, it is possible that AMPA binding at ED 7 could correspond to these sites.

A direct trophic action of amino acids through synaptic receptors has been demonstrated in different regions of the CNS including the retina^{32,33,35}. In some cases, as for the cholinergic muscarinic system²³ and for [³H]muscimol binding sites in the chick retina, receptors undergo affinity changes during development. In the latter case, the presence of receptors allows the trophic effect of cAMP³¹; therefore, the presence of excitatory amino acid receptors of the AMPA/QA-type at early developmental stages could be linked to the initiation of regulatory processes such as cyclic nucleotide-mediated actions.

REFERENCES

- Anand, H., Roberts, P.J. and López-Colomé, A.M., Excitatory amino acids in the chick retina: possible involvement of cyclic guanosine monophosphate, *Neurosci. Lett.*, 58 (1985) 31-36.
- Baudry, M., Arst, D., Oliver, M. and Lynch, G., Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus, *Dev. Brain Res.*, 1 (1981) 37-48.
- Biziere, K. and Coyle, J.T., Localization of receptors for kainic acid on neurons in the inner nuclear layer of retina, *Neuropharmacology*, 18 (1979) 409-413.
- Bloomfield, S.A. and Dowling, J.E., The actions of aspartate, glutamate and their analogs on retinal neurons of the rabbit, *Soc. Neurosci. Abstr.*, 8 (1982) 131.
- Campañá, H. and Suburo, A., The effect of kainic acid on the developing chick retina, *Dev. Brain Res.*, 26 (1986) 315-317.
- Campochiaro, P. and Coyle, J.T., Ontogenetic development of kainate neurotoxicity: correlates with glutamatergic innervation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75 (1978) 2025-2029.
- Changeux, J.P. and Danchin, A., Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks, *Nature (Lond.)*, 264 (1976) 705-712.
- Coleman, P.A., Massey, S.C. and Miller, R.F., Kynurenic acid distinguishes kainate and quisqualate receptors in the vertebrate retina, *Brain Res.*, 381 (1986) 172-175.
- 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 systems, *Comp. Biochem. Physiol.*, 27 (1982) 211-224.
- De Barry, J., Vincendon, G. and Gombos, G., High-affinity glutamate binding during postnatal development of rat cerebellum, *FÉBS Lett.*, 109 (1980) 175-179.
- Foster, A.C. and Fagg, G., Acid amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors, *Brain Res. Rev.*, 7 (1984) 103-164.
- Foster, G.A. and Roberts, P.J., Kainic acid stimulation of cerebellar cyclic GMP levels: potentiation by glutamate and related amino acids, *Neurosci. Lett.*, 23 (1981) 67-70.
- Fricke, V., A new scintillation cocktail based on Triton X-100, *Anal. Biochem.*, 63 (1975) 555-558.
- Garthwaite, G. and Garthwaite, J., In vitro neurotoxicity of excitatory amino acid analogues during cerebellar development, *Neuroscience*, 17 (1986) 755-767.
- Gibson, B.L. and Reif-Lehrer, L., In vitro effects of kainate on embryonic and posthatching chick retina, *Dev. Brain Res.*, 15 (1984) 97-103.
- Gibson, B.L., Schwarz, R. and Reif-Lehrer, L., Quinolininate: a selective neurotoxin in embryonic and posthatching chicken retinas, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 26 (1985) 50-57.
- Grun, G., The development of the vertebrate retina: a comparative survey. In F. Beck, W. Hild, J. van Limbogh, R. Ortman, J.E. Pauly and T.H. Schiebler (Eds.), *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, Vol. 78, Springer, Berlin, 1982.
- Hampton, C.K., Garcia, C. and Redburn, D.A., Localization of kainic acid-sensitive cells in mammalian retina, *J. Neurosci. Res.*, 6 (1981) 99-111.
- Hockel, S.H.J. and Muller, W.E., L-Glutamate receptor binding in bovine retina, *Exp. Eye Res.*, 35 (1982) 55-60.
- Honoré, T., Lauridsen, J. and Krosgaard-Larsen, P., The binding of [³H]AMPA, a structural analogue of glutamic acid, to rat brain membranes, *J. Neurochem.*, 38 (1982) 173-178.
- Hyndman, A.G., The effects of glutamate and kainate on

- cell proliferation in retinal cultures, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 25 (1984) 558-563.
- 22 Ishida, A.T. and Neyton, J., Quisqualate and L-glutamate inhibit retinal horizontal-cell responses to kainate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 (1985) 1837-1841.
- 23 Large, T.H., Cho, N.J., De Mello, F.G. and Klein, W.L., Molecular alteration of a muscarinic acetylcholine receptor system during synaptogenesis. *J. Biol. Chem.*, 260 (1985) 8873-8881.
- 24 Lasater, E.M. and Dowling, J.E., Carp horizontal cells in culture respond selectively to L-glutamate and its agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79 (1982) 936-940.
- 25 Lasater, E.M., Dowling, J.E. and Ripps, H., Pharmacological properties of isolated horizontal and bipolar cells from the skate retina. *J. Neurosci.*, 4 (1984) 1966-1975.
- 26 López-Colomé, A.M., High-affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. *Neurochem. Res.*, 6 (1981) 1019-1033.
- 27 López-Colomé, A.M. and Roberts, P.J., Effect of excitatory amino acid analogues on the release of D-[³H]aspartate from chick retina. *Eur. J. Pharmacol.*, in press.
- 28 López-Colomé, A.M. and Somohano, F., Characterization of L-[³H]aspartate binding to chick retinal subcellular fractions. *Vision Res.*, 22 (1982) 1495-1501.
- 29 López-Colomé, A.M. and Somohano, F., Localization of L-glutamate and L-aspartate synaptic receptors in chick retinal neurons. *Brain Res.*, 298 (1984) 159-162.
- 30 López-Colomé, A.M. and Somohano, F., Characterization of quisqualate type L-glutamate receptors in the retina. *Brain Res.*, 414 (1987) 99-108.
- 31 Madtes, P. and Adler, R., Development of muscimol binding sites in chick embryo neural retina 'in vivo' and 'in vitro': regulatory effects of cyclic AMP. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 3 (1985) 511-519.
- 32 Madtes, P. and Redburn, D.A., GABA as a trophic factor during development. *Life Sci.*, 33 (1983) 979-984.
- 33 Madtes, P. and Redburn, D.A., Synaptic interactions in the GABA system during postnatal development in retina. *Brain Res. Bull.*, 10 (1983) 741-745.
- 34 Mangel, S.C., Ariel, M. and Dowling, J.E., Effects of amino acid drugs on response properties of fish horizontal cells. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 8 (1982) 132.
- 35 Meier, E., Hansen, G.H. and Schousboe, A., The trophic effect of GABA on cerebellar granule cells is mediated by GABA-receptors. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 3 (1985) 401-407.
- 36 Massey, S.C. and Redburn, D.A., Transmitter circuits in the vertebrate retina. *Prog. Neurobiol.*, 28 (1987) 55-96.
- 37 Miller, R.F. and Slaughter, M.M., Excitatory amino acid receptors in the vertebrate retina. In W.W. Morgan (Ed.), *Retinal Transmitters and Modulators: Models for the Brain*, Vol. II, CRC Press, Florida, 1985, pp. 123-160.
- 38 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 (1982) 241-246.
- 39 Mitchell, C., Hampton, C. and Redburn, D., Localization of receptor and transport sites for glutamate and aspartate in inner plexiform layer of bovine retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 20 (1981) 215-219.
- 40 Morgan, I.G. and Ingham, C.A., Kainic acid affects both plexiform layers of chicken retina. *Neurosci. Lett.*, 21 (1981) 275-280.
- 41 Neal, M.J., Amino acid transmitter substances in the vertebrate retina. *Gen. Pharmacol.*, 7 (1976) 321-332.
- 42 Rowe, J.S. and Ruddock, K.H., Hyperpolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter antagonists. *Neurosci. Lett.*, 30 (1982) 251-256.
- 43 Rowe, J.S. and Ruddock, K.H., Depolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter agonists. *Neurosci. Lett.*, 30 (1982) 257-262.
- 44 Sanderson, C. and Murphy, S., Glutamate binding in the rat cerebral cortex during ontogeny. *Dev. Brain Res.*, 2 (1982) 329-339.
- 45 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) 1230-1232.
- 46 Slaughter, M.M. and Miller, R.F., Bipolar cells in the mudpuppy retina use an excitatory amino acid neurotransmitter. *Nature (Lond.)*, 303 (1983) 537-538.
- 47 Slevin, J.T. and Coyle, J.T., Ontogeny of receptor binding sites for [³H]glutamic acid and [³H]kainic acid in the rat cerebellum. *J. Neurochem.*, 37 (1981) 531-533.
- 48 Tapia, R. and Arias, C., Selective stimulation of neurotransmitter release from chick retina by kainic and glutamic acids. *J. Neurochem.*, 39 (1982) 1169-1177.
- 49 Vovklatou, G., Angelatos, F. and Kouvelas, E.D., The binding properties and regional ontogeny for [³H]glutamic acid Na⁺-independent and [³H]kainic acid binding sites in chick brain. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 4 (1986) 339-352.
- 50 Watkins, J.C. and Evans, R.H., Excitatory amino acid transmitters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21 (1981) 165-204.
- 51 Weiland, G.A. and Molinoff, P.B., Quantitative analysis of drug-receptor interactions: I. Determination of kinetic and equilibrium properties. *Life Sci.*, 29 (1981) 313-330.
- 52 Woodward, D.J., Hoffer, B.J., Siggins, G.R. and Bloom, F.E., The ontogenetic development of synaptic functions, synaptic activation and responsiveness to neurotransmitter substances in rat cerebellar Purkinje cells. *Brain Res.*, 34 (1971) 75-97.

I.b. RECEPTORES SINAPTICOS. Diferenciación in vitro.

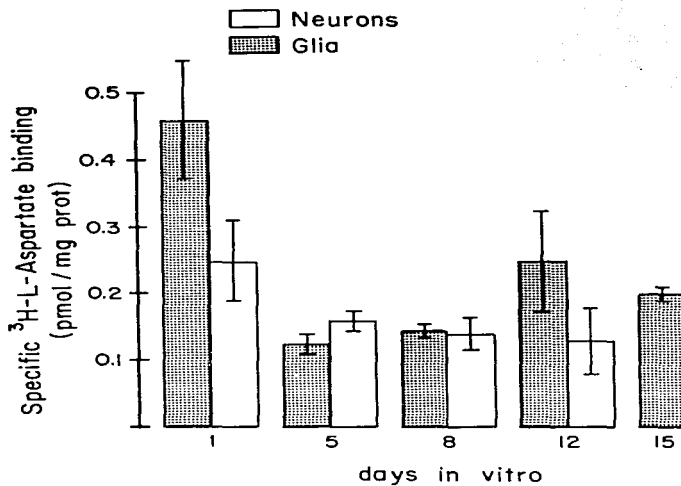
Se caracterizó tanto cinética como farmacológicamente la unión específica de $^3\text{H-L-Asp}$ como marcador de los receptores de tipo NMDA y $^3\text{H-AMPA}$ como marcador de los receptores de QA, en cultivos enriquecidos en neuronas o células gliales de la retina en distintas etapas de diferenciación.

Unión específica de $^3\text{H-Asp}$.

La figura 11 muestra la curva de aparición de la unión de $^3\text{H-Asp}$ durante la diferenciación de neuronas o células gliales en cultivos de distintas edades: 1, 5, 8, 12 y 15 DIV. Al primer DIV, la unión de $^3\text{H-Asp}$ alcanza el valor más alto tanto en las neuronas como en la glía, aunque en ésta última aumenta nuevamente en los cultivos diferenciados (12 y 15 DIV).

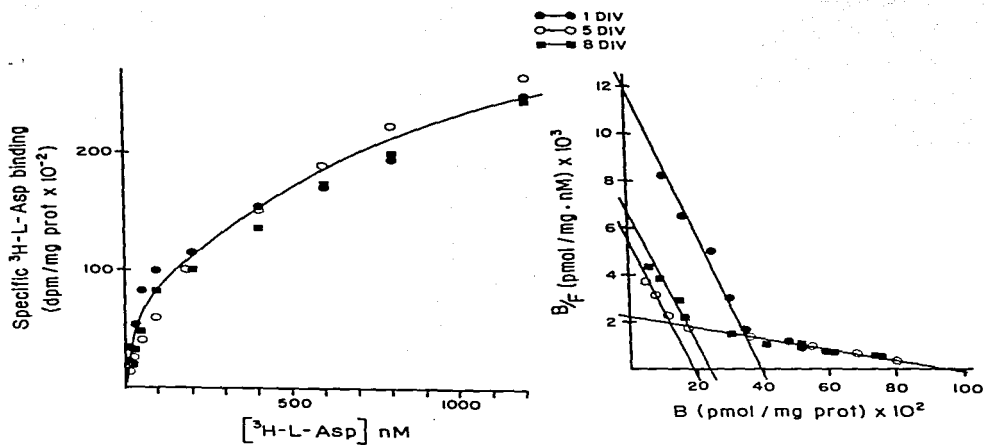
Al estudiar la curva de saturación de la unión de $^3\text{H-Asp}$ en una gama de concentraciones entre 12.5 nM y 1.2 μM y analizarla por el método de Scatchard observamos, en los cultivos de neuronas y células gliales de todas las edades, una cinética con dos componentes que, sin embargo, varían dependiendo del tipo y la edad del cultivo. En las neuronas (Fig. 12), el componente de baja afinidad muestra una $K_B = 429$ nM y una B_{max} de 0.95 pmol/mg proteína a todas las edades, mientras que el número de receptores de alta afinidad varía durante la diferenciación con una B_{max} de 0.39 pmol/mg proteína al primer DIV, 0.19 pmol/mg proteína a los 5 DIV, y 0.24 pmol/mg proteína a los 8 DIV, sin que cambie la afinidad ($K_B = 33-36$ μM). En cuanto a las células gliales (Fig. 13), al primer día de cultivo las constantes cinéticas son muy similares a las de los cultivos de neuronas de la misma edad (K_B

FIGURA 11
DESARROLLO DE LA UNION DE ^3H -ASP EN CELULAS EN CULTIVO



La figura muestra la unión específica de ^3H -L-Asp a neuronas o células gliales cultivadas de distintas edades: 1, 5, 8, 12 ó 15 DIV. Los resultados son el promedio \pm S.E.M. de 3 a 5 experimentos realizados por triplicado.

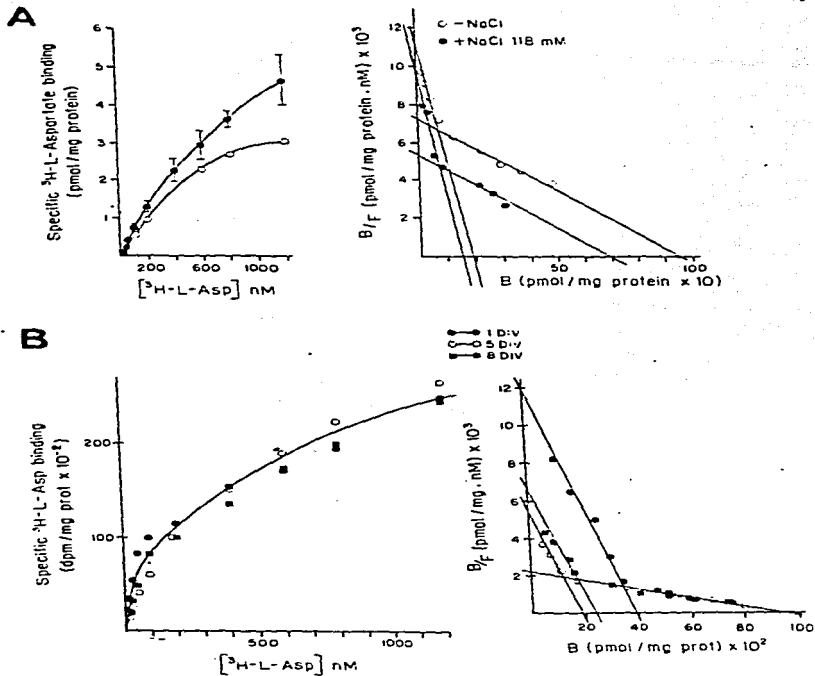
FIGURA 12
 CINETICA DE LA UNION DE ^3H -ASP A NEURONAS EN CULTIVO



La unión específica de ^3H -L-Asp a neuronas de 1, 5, y 8 DIV muestra una cinética saturable con dos componentes: uno de alta afinidad ($K_B = 33\text{-}36$ nM) y cuya B_{max} varía de acuerdo con la edad en cultivo (0.39, 0.19 y 0.24 pmol/mg proteína a los 1, 5 y 8 DIV, respectivamente), y uno de baja afinidad, con una $K_B = 429$ nM y $B_{\text{max}} = 0.95$ pmol/mg proteína a todas las edades.

FIGURA 13

CINETICA DE LA UNION DE ^3H -ASP A CELULAS GLIALES



En los cultivos de células gliales se identificaron tres poblaciones de receptores para ^3H -Asp: una de alta afinidad por el L-Asp con una $K_B = 40$ nM y $B_{\text{max}} = 0.88$ pmol/mg proteína, otra de menor afinidad ($K_B = 216-440$ nM y $B_{\text{max}} = 0.95 - 3$ pmol/mg proteína) y otra de muy baja afinidad con una $K_B = 1.3$ μM y $B_{\text{max}} = 6.9$ pmol/mg proteína. Los dos primeros coexisten en las células de 1 DIV (A) y los dos de menor afinidad en las células de 12 DIV (B). Cuando los receptores de las células gliales de 12 DIV se miden en presencia de NaCl 118 mM, la B_{max} del sistema de muy baja afinidad aumenta significativamente alcanzando un valor de 9.5 pmol/mg proteína.

= 40 nM y $B_{max} = 0.88$ pmol/mg prot para el de alta afinidad y $K_B = 441$ nM y $B_{max} = 2.96$ pmol/mg prot para el de baja afinidad); en cambio, en los cultivos diferenciados (12 DIV) ya no se observa el sistema de alta afinidad y, en cambio, además del sistema de baja afinidad (que presenta una $K_B = 216$ nM y una B_{max} de 1.8 pmol/mg proteína), aparece otro con aún menor afinidad ($K_B = 1.3$ μ M y $B_{max} = 6.9$ pmol/mg proteína). El número de esta última población de receptores aumenta significativamente (con un cambio de B_{max} de 6.9 a 9.5 pmol/mg proteína) al realizar los ensayos, en los cultivos de células gliales de 12 DIV, en presencia de NaCl 118 mM.

La farmacología de la unión de 3 H-Asp en cultivos de 1 DIV (neuronas y células gliales inmaduras) y en neuronas y células gliales maduras (8 y 12 DIV, respectivamente) se muestra en la Tabla 3. En ambos tipos de cultivo, la capacidad de los distintos análogos a una concentración de 1 mM para desplazar al 3 H-Asp 50 nM, comparada con la del propio L-Asp (también 1 mM), disminuye significativamente con la diferenciación, a excepción del KA, el QA y el DHKA que, en las células gliales, únicamente desplazan al 3 H-Asp a los 12 DIV. En el caso de las neuronas, la farmacología de la unión de 3 H-Asp presenta el perfil típico de los receptores de tipo NMDA, con la salvedad de que el AMPA también es un potente desplazador. Así, considerando la unión de 3 H-Asp desplazable por L-Asp 1 mM como el 100% de la unión específica, los compuestos que desplazan más del 80% al primer DIV, o más del 50% a los 8 DIV son el L- y el D-Asp, el L-Glu, el NMDA, el APV y el AMPA. En las células gliales, en cambio, este

TABLA 3
FARMACOLOGIA DE LA UNION DE ³H-ASP

ANALOGO (1 mM)	% DE INHIBICION			
	NEURONAS		GLIA	
	1 DIV	8 DIV	1 DIV	12 DIV
L-Aspartato	100	100	100	100
D-Aspartato	100	65	110	33
L-Glutamato	91	69	96	66
D-Glutamato	93	25	78	54
Kainato	67	49	-	29
Quiscualato	41	-	-	55
N-metil-DL-aspartato	98	N.D.	110	44
amino fosfonovalerato	83	58	99	46
amino fosfonobutirato	48	12	79	66
GDEE	79	N.D.	101	56
AMPA	83	51	142	53
dihidro-kainato	48	-	-	97
DL-asp- β -hidroxamato	17	-	70	27
Glu-4-monohidroxamato	17	-	39	54
GABA	-	-	-	-
Glicina	-	-	-	-

La capacidad de distintos agonistas y antagonistas de los receptores a AAE, así como de otros aminoácidos considerados como neurotransmisores en el SNC (GABA y Gli), para inhibir la unión de ³H-L-Asp a células de retina en cultivo, se comparó con la del L-Asp (considerada aquí como el 100%, y que corresponde a 50% de unión específica). Los experimentos se hicieron como se describe en la sección de métodos, a 4°C y en ausencia de sodio. ND = no determinado; - = no desplaza.

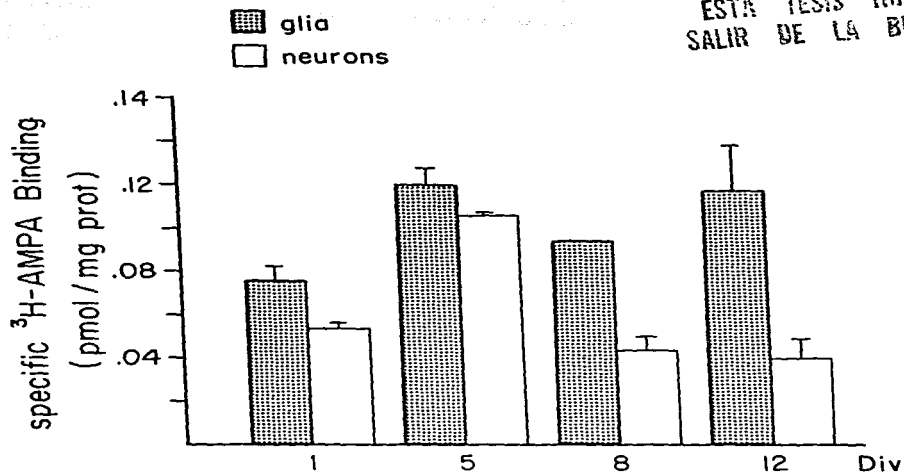
perfil se observa únicamente en las células inmaduras y a los 12 DIV los compuestos que desplazan más del 50% del $^3\text{H-Asp}$ unido al receptor son, además del L-Asp, el L- y el D-Glu, el QA, el APB, el GDEE, el AMPA y el DHKA, que es la farmacología típica de un receptor tipo NO-NMDA.

Unión específica de $^3\text{H-AMPA}$.

El desarrollo de los receptores para $^3\text{H-AMPA}$ en cultivos enriquecidos en neuronas o células gliales de la retina se muestra en la figura 14. Como puede observarse, la unión específica de $^3\text{H-AMPA}$ varía poco a lo largo de la diferenciación; sin embargo, su evolución es distinta en las neuronas y en las células gliales. En estas últimas, hay un incremento significativo de la unión específica entre los días 1 y 5 in vitro, y a partir de ese momento se mantiene constante. En las neuronas también se observa un incremento a los 5 DIV; sin embargo, no se mantiene en este nivel y a los 8 y 12 DIV presenta nuevamente los valores del 1 DIV,

La farmacología de la unión de $^3\text{H-AMPA}$ (Tabla 4) también es distinta en las neuronas y en las células gliales. En las neuronas, los desplazadores más potentes del $^3\text{H-AMPA}$ a todas las edades son los agonistas y antagonistas del receptor de tipo NMDA, aunque la potencia relativa con que estos compuestos desplazan al $^3\text{H-AMPA}$ varía con la diferenciación: los agonistas (L-Asp y NMDA) se vuelven menos potentes que los antagonistas (APV) a los 12 DIV, al contrario de lo que se observa en los primeros días in vitro. Los agonistas de los receptores de tipo

FIGURA 14
UNION ESPECIFICA DE ^3H -AMPA A CELULAS EN CULTIVO



La unión específica de ^3H -AMPA se determinó en cultivos primarios enriquecidos en neuronas o células gliales de la retina en distintas etapas de diferenciación. Los resultados son el promedio \pm S.E.M. de 2 a 3 experimentos realizados por triplicado.

TABLA 4
FARMACOLOGIA DE LA UNION DE ^3H -AMPA

ANALOGO (1 mM)	% INHIBICION							
	NEURONAS				GLIA			
	1	5	8	12	1	5	8	12 DIV
AMPA	100	100	100	100	100	100	100	100
L-Glu	115	80	123	130	82	130	71	89
QA	43	13	34	-	20	-	71	26
APB	92	56	102	157	ND	ND	ND	ND
APV	119	60	116	203	25	69	-	-
NMDA	149	100	202	137	19	53	-	-
D-Glu	115	44	16	73	ND	ND	ND	ND
KA	55	26	-	20	127	55	82	92
L-Asp	155	150	141	93	106	44	35	10
D-Asp	87	24	-	8	ND	ND	ND	ND
GDEE	9	22	-	5	ND	ND	ND	ND

El porcentaje de inhibición de la unión de ^3H -AMPA (25 nM) por distintos análogos de los AAE se muestra en relación con el desplazamiento por AMPA (100% que corresponde a 30% de unión específica). Los experimentos se hicieron por triplicado como se describe en la sección de Métodos, a 4°C, en ausencia de sodio.

NO-NMDA (QA y KA), así como los isómeros D- del glutamato y el aspartato también desplazan al ^3H -AMPA en los primeros DIV, aunque mucho menos que los anteriores, y pierden la capacidad de desplazarlo a medida que las células se diferencian. En las células gliales, por el contrario, los desplazadores más potentes del ^3H -AMPA a todas las edades son los agonistas de los receptores de tipo NO-NMDA (L-Glu, KA y AMPA). El ácido quiscuálico, a pesar de no ser tan potente como los anteriores, aumenta considerablemente su capacidad de desplazar al ^3H -AMPA conforme avanza la diferenciación, al contrario de lo que sucede en las neuronas. Los agonistas y antagonistas del receptor de NMDA (L-Asp, NMDA y APV) son poco potentes como desplazadores del ^3H -AMPA en las células gliales en los primeros días de cultivo, y pierden totalmente la capacidad de desplazarlo en las células maduras.

Discusión

Los resultados muestran que en los cultivos de células disociadas de la retina de pollo se expresan los diferentes tipos de receptores para AAE: NMDA y NO-NMDA. Al igual que sucede durante el desarrollo ontogenético (Somohano y López Colomé, 1987), estos receptores adquieren especificidad farmacológica a lo largo de la diferenciación. y, como puede inferirse por los cambios en la farmacología, se restringen a determinados tipos celulares. Así, en los cultivos de neuronas de 8 DIV parecen predominar los receptores de tipo NMDA, mientras que en las células gliales de 12 DIV es posible identificar receptores de tipo NO-NMDA, en particular del subtipo del QA.

En la unión de $^3\text{H-Asp}$ a las células gliales de 12 DIV se observa por primera vez un sistema de baja afinidad ($K_B = 1.3 \mu\text{M}$) que podría corresponder al sistema de menor afinidad ($K_B = 1.8 \mu\text{M}$) que se observa en la cinética de la unión de $^3\text{H-Asp}$ en embriones de 18 días DE (ver figura 3 en la publicación #1). De ser así, la aparición de esta población de receptores podría explicar el aumento en la unión específica de $^3\text{H-Asp}$ que se observa al final del DE (ver publicación #1). Los sitios que unen $^3\text{H-Asp}$ con alta afinidad (K_B en el orden de $40 \mu\text{M}$), por el contrario, parecen localizarse únicamente en las neuronas de la retina, o bien restringir su localización a estas células durante la diferenciación celular.

En muchos aspectos la evolución de los receptores para AAE en las células en cultivo coincide con la que se observa durante el desarrollo ontogenético in vivo. Esto sugiere que el cultivo de células disociadas de la retina podría ser un buen modelo para estudiar los factores que inducen esta evolución. Sin embargo, existen también algunas diferencias, como por ejemplo el curso temporal de la aparición de la unión específica de los distintos ligandos, que pudieran reflejar la falta de ciertas interacciones entre diferentes tipos celulares, y que hay que tener en cuenta cuando se intente hacer extrapolaciones entre ambos sistemas.

2. RECEPTORES PRESINAPTICOS (AUTORRECEPTORES).

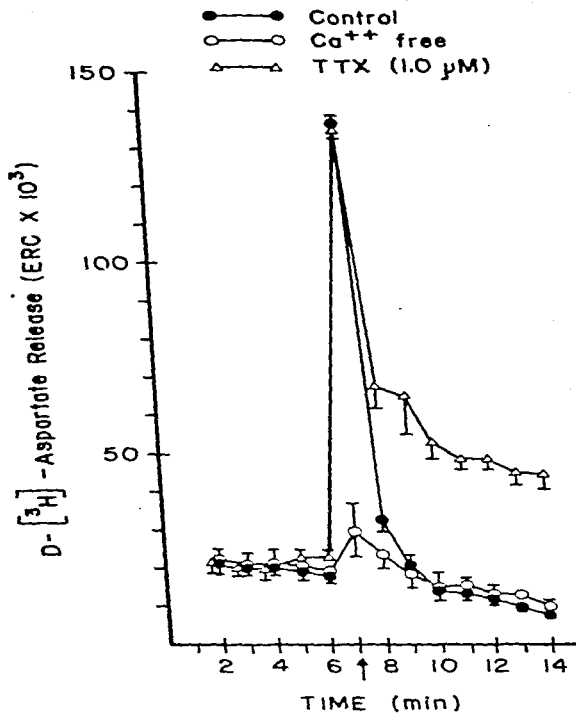
Se estudió la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ estimulada por alto potasio de retinas completas aisladas de embriones de pollo de 7, 8, 11, 14, 18 y 21 días de desarrollo embrionario (DE), así como el efecto de agonistas y antagonistas de los receptores para AAE sobre esta liberación. La figura 15 muestra el control en retinas de animales adultos. En ella puede observarse que el cambio de un medio Krebs-bicarbonato normal a uno con 47 mM de KCl en presencia de CaCl_2 2.5 mM produce un aumento en la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$. La presencia de tetrodotoxina (TTX) en el medio de estimulación no tiene efecto sobre este aumento, lo que implica que la liberación proviene de células que no presentan potenciales de acción, como se ha descrito para todas las células de la retina a excepción de las células amacrinas (Dowling, 1979). La falta de Ca^{++} en el medio de estimulación, por el contrario, inhibe la liberación producida por el alto K^+ en un 80%. En los resultados de la liberación en la retina de embriones, el término "liberación estimulada por K^+ " se refiere exclusivamente a la magnitud del aumento en la liberación, calculada como la diferencia entre el valor máximo de estimulación (al mín. 7) y el valor preestimulación (al mín. 6).

Desarrollo de la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$.

Como puede observarse en la figura 16, a principio del DE (días 7 y 8), la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ depende casi exclusivamente de la despolarización de las células. Este patrón se invierte a lo largo del desarrollo: entre los días 11 y 14 el

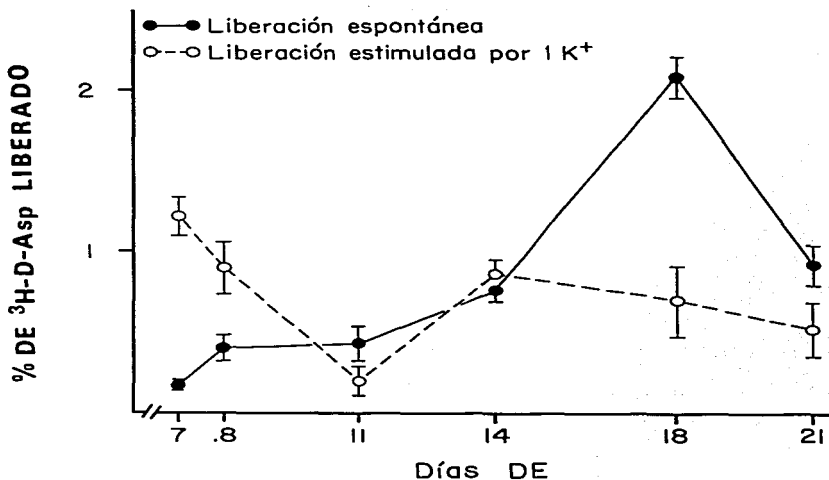
FIGURA 15

ESTIMULACION DE LA LIBERACION DE $^3\text{H-D-ASP}$ POR ALTO POTASIO



La gráfica muestra un control en retinas de pollos adultos ($n = 10-12$), preincubadas con $1 \mu\text{Ci}$ de $^3\text{H-D-Asp}$. Las retinas se superfundieron durante 6 min con Ringer Krebs-bicarbonato y a partir del minuto 7 con el mismo medio + 47 mM KCl en presencia (\bullet) o ausencia (\circ) de CaCl_2 2.5 mM , o en presencia de TTX $1 \mu\text{M}$ (Δ). Al medio sin calcio se le agregó EGTA 1 mM .

FIGURA 16
DESARROLLO DE LA LIBERACION DE $^3\text{H-D-ASP}$



La liberación espontánea (●) de $^3\text{H-D-Asp}$ (porcentaje liberado al minuto 6 de la superfusión) aumenta a lo largo del DE alcanzando su valor máximo en las retinas de embriones de 18 días. La liberación estimulada por 47 mM de KCl (○) (diferencia entre el porcentaje liberado al minuto 7 y el del minuto 6), por el contrario, tiende a disminuir. Los datos son el promedio \pm S.E.M. de 9 a 12 experimentos.

porcentaje de liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ con alto K^+ es aproximadamente el doble de lo que se libera en el medio normal. A partir del día 14, la cantidad liberada por despolarización es mucho menor que la liberación espontánea y al día 18 DE, el 75% de la liberación total corresponde a la liberación espontánea.

Dependencia de calcio.

La dependencia de calcio de la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ (Fig. 17) se adquiere al final de la segunda semana de incubación y alcanza, al día 14 DE, el mismo patrón que se observa en el adulto en donde más del 80% de la liberación depende de Ca^{++} .

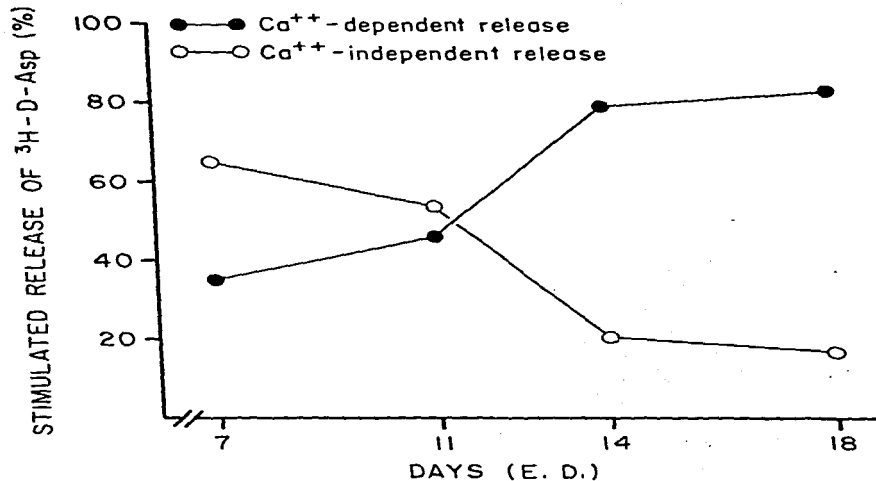
Efecto de los AAE sobre la liberación estimulada por K^+ .

La figura 18 muestra el efecto de distintos análogos de los AAE sobre la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ estimulada por potasio considerada, en todos los casos, como el 100%. Como agonistas de los diferentes subtipos de receptores se utilizaron KA (1mM), APB (1mM) y NMDA (200 μM); como antagonistas, GDEE (1 mM) y APV (200 μM); y como agonista general, L-glu (50 y 100 μM).

A los 7 DE, el KA es el único compuesto que tiene un efecto significativo sobre la liberación y, al contrario de lo que se había observado en la retina de animales adultos, potencia la liberación. Durante las dos primeras semanas de incubación, el NMDA no afecta significativamente la liberación; sin embargo, otros análogos como el KA, el APB e incluso el APV inhiben la liberación, como sucede en el adulto, a partir del día 11 DE y el efecto inhibitor del L-glu y del GDEE aumenta notablemente entre los días 11 y 14 DE.

FIGURA 17

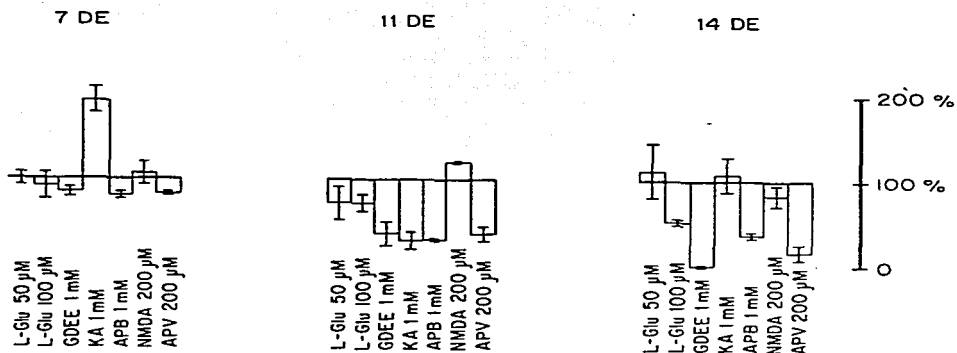
DEPENDENCIA DE CALCIO DE LA LIBERACION DE $^3\text{H-D-ASP}$



La figura muestra, con respecto a la cantidad de $^3\text{H-D-Asp}$ liberada durante 1 min al estimular las retinas de embriones de distintas edades con Ringer Krebs-bicarbonato (CaCl_2 2.5 mM) con alto potasio (100 %), el porcentaje liberado cuando el CaCl_2 se omite en el medio de estimulación y se añade EGTA 1 mM (O). La liberación dependiente de calcio (●) se calculó como la diferencia entre el 100% y la liberación independiente de Ca^{++} . Los datos son el promedio de 3 a 5 experimentos.

FIGURA 18

EFFECTO DE LOS AAE SOBRE LA LIBERACION DE $^3\text{H-D-ASP}$



En la retina de pollo, los AAE, a las concentraciones indicadas en la figura, inhiben la liberación de $^3\text{H-D-ASP}$ estimulada por alto K^+ (100%) a partir del día 11 DE. A los 7 días DE, por el contrario, algunos AAE como el KA potencian esta liberación. Los resultados son el promedio de 3 experimentos \pm S.E.M.

Discusión.

El efecto de los AAE sobre la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ estimulada por alto K^+ pretende simular el efecto que tendría el transmisor liberado sobre la liberación de ese mismo transmisor ante una segunda despolarización de la célula presináptica. Los resultados muestran que en la retina de pollo, la regulación de la liberación de AAE a través de receptores presinápticos ocurre desde etapas muy tempranas del DE. Esta regulación en etapas tempranas, sin embargo, es distinta a la que se observa posteriormente y en el adulto y coincide con las etapas previas al inicio de la sinaptogénesis en la retina de pollo. Existen dos posibilidades para explicar estos resultados:

- a) que los receptores que median la inhibición presináptica en los animales adultos se expresen paralelamente al establecimiento de los primeros contactos sinápticos (alrededor del día 10 DE) y a la adquisición de la dependencia de Ca^{++} de la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$. En este caso, los efectos de algunos AAE sobre la liberación en etapas previas podrían estar mediados por otra población de receptores (como podrían ser los sitios de alta afinidad para el $^3\text{H-AMPA}$ (ver publicación #1)). Otra posibilidad es que este efecto potenciador sea un efecto inespecífico no mediado por receptores sino por algún otro mecanismo.
- b) que los receptores presinápticos para AAE aparezcan en etapas tempranas pero su acoplamiento con los mecanismos que inducen la inhibición de la liberación (ver p.39 y 40) aparezcan posteriormente.

3. CAPTACION

Se caracterizó bioquímicamente la acumulación de $^3\text{H-D-Asp}$ en cultivos de neuronas o células gliales de la retina de 1, 5, 8 y 12 días in vitro (DIV). Se encontró que la captación de $^3\text{H-D-Asp}$ depende de Na^+ y de temperatura desde el primer DIV (Fig. 2 de la publicación # 2) y presenta las siguientes características:

Características cinéticas de la captación de $^3\text{H-D-Asp}$.

Las curvas de saturación de la acumulación de $^3\text{H-D-Asp}$ se muestran en la figura 4 (de la publicación # 2).

En los cultivos de neuronas se encontró, a todas las edades, una cinética saturable y de alta afinidad para la captación de $^3\text{H-D-Asp}$. La afinidad de los sitios prácticamente no varía con la edad del cultivo ($K_m = 8 \mu\text{M}$ al primer DIV y $13 \mu\text{M}$ a los 5 y 8 DIV). El número de sitios, sin embargo, aumenta significativamente entre los días 1 y 5 in vitro ($V_{\text{max}} = 2.9 \text{ nmol/mg proteína/10 min}$ a las 24 horas, y $23.96 \text{ nmol/mg proteína/10 min}$ a los 5 DIV), y a partir de ese momento, se mantiene constante.

En los cultivos de células de Müller se determinó una cinética de menor afinidad ($K_m = 100-134 \mu\text{M}$) que en las neuronas. La capacidad de este sistema de captación aumenta con la edad del cultivo: $V_{\text{max}} = 41, 104, 215$ y $118 \text{ nmolas/mg proteína/10 min}$ a los 1, 5, 8 y 12 DIV, respectivamente.

Farmacología de la captación de $^3\text{H-D-Asp}$.

En la Tabla 1 (de la publicación # 2) se muestra el efecto de inhibidores competitivos de la captación en otros sistemas (L-Glu, L-Asp, D-Glu, ac. dihidrokaínico, DL-Asp- β -hidroxamato y Glu-4-monohidroxamato), así como de inhibidores competitivos de

la unión de $^3\text{H-Glu}$ a receptores postsinápticos (GDEE, APV y APB) y otros L-aminoácidos no neuroactivos (L-leu y L-lis), sobre la captación de $^3\text{H-D-Asp}$ en las células en cultivo. A una concentración de 500 μM , los inhibidores más potentes fueron el L-Glu, el L-Asp y el DL-Asp- β -hidroxamato. Por este motivo, se determinaron los valores de IC_{50} para estos compuestos en los cultivos de neuronas y de células de Müller de 1 y 8 DIV. Como se observa en la Tabla 2 (de la publicación #2), en las neuronas se incrementa la potencia de estos inhibidores con la edad del cultivo, mientras que en las células de Müller sucede lo contrario.

También se estudió el efecto de algunos inhibidores metabólicos como la ouabaína (10^{-4} M) y el 2,4-dinitrofenol (10^{-5} M) sobre la captación de $^3\text{H-D-Asp}$ (Tabla 3 de la publicación #2). En el caso de ambos compuestos se observó una inhibición máxima (alrededor de 30%) en los cultivos de neuronas de 8 DIV y en los de células de Müller de 1 DIV.

Discusión

Los resultados muestran que, al igual que sucede en otras regiones del SNC, los sitios de captación para AAE aparecen en etapas muy tempranas del desarrollo. En número de sitios de captación aumenta considerablemente con la edad en cultivo tanto en las neuronas como en las células de Müller. Este aumento se da entre los días 1 y 5 in vitro, lo cual coincide con el momento en que es posible reconocer morfológicamente las primeras sinapsis en los cultivos de neuronas de la retina (Grosse et al., 1987). En el hipocampo (Schmidt y Wolf, 1988) y en vesículas

sinápticas de cerebro (Kish et al., 1989) se ha demostrado un aumento en la capacidad de los sistemas de captación de alta afinidad de AAE que ocurre de manera paralela al inicio de la sinaptogénesis. En los cultivos de células de Müller, la capacidad máxima del sistema de captación se alcanza a los 8 DIV. Esto coincide con el aumento de los receptores para $^3\text{H-Glu}$ en la retina de embriones de edad equivalente (Somohano y López Colomé, 1987). Los resultados de este trabajo sugieren, por lo tanto, que a través del aumento en la capacidad de los sistemas de captación podría reducirse la concentración extracelular de AAE al establecerse los primeros contactos sinápticos, evitándose así efectos excitotóxicos.

PUBLICACION # 2

CHARACTERISTICS OF EXCITATORY AMINO ACID UPTAKE IN
CULTURES FROM NEURONS AND GLIA FROM THE RETINA

Somohano, F. and López-Colomé, A.M.

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
UNAM. México, D.F. México.

Please send all correspondence regarding this manuscript to:

Dr. Ana María López-Colomé
Departamento de Neurociencias
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Apdo. Postal 70-600
04510 México, D.F.
Tel: (905) 550-5215 x 4933
FAX: (905) 548-0387

ABSTRACT

³H-D-Aspartate uptake was biochemically characterized in cultures from chick retina enriched in glial (Müller) cells or neurons during progressive days in vitro (DIV). In the neuronal cultures a high-affinity, Na⁺-dependent system was found with Km = 8-13 μM, and pharmacological characteristics in agreement with those of reuptake systems in other regions of the CNS. The uptake system in glial cells showed a lower affinity with Km = 100-135 μM. In both cases, uptake was temperature- and energy-dependent. A sharp increase in the Vmax of uptake was observed in both neuronal and glial cultures at 5 DIV, at which morphologically mature synapses have been shown to be present in retinal cultures. A parallel increase in the pharmacological specificity of the uptake system in neuronal cultures was observed, with a rise in the efficiency of D-Asp, L-Asp, L-Glu and DL-asp-β-hydroxamate for inhibiting ³H-D-Aspartate uptake. Results suggest the possibility of reuptake participating in the regulation of extracellular glutamate concentration during development.

KEY WORDS

EAA, uptake, development, retina.

INTRODUCTION

Excitatory amino acids (glutamate and aspartate) are considered as putative neurotransmitters in the vertical pathway of the vertebrate retina (Cervetto and MacNichol, 1972; Murakami et al., 1972; Sugawara and Negishi, 1973). The excitatory effect of synaptically released glutamate (Glu) is arrested through the activity of a high-affinity, Na^+ -dependent reuptake mechanism common to L-Glu, L-Asp and D-Asp (Logan and Snyder, 1971; Balcar and Johnston, 1972), present both in glial cells and presynaptic terminals (Lund Larsen, 1978). Autoradiographic studies in several species have shown Na^+ -dependent, high affinity glutamate and aspartate accumulation in the retina of adult animals (Ehinger and Falck, 1971; Ehinger, B, 1977; Marc and Lam, 1981; Hampton and Redburn, 1983). Glutamate uptake has also been demonstrated in the retina of developing animals (Bondy and Purdy, 1977; Casper et al., 1980) as well as in primary cultures of both neurons and glia (Hyndman and Adler, 1982) from the retina. In the adult retina of several species such as the rat (White and Neal, 1976) and the rabbit (Thomas and Redburn, 1978), the uptake system for EAA has also been biochemically characterized showing a high-affinity uptake system with K_m values between 1 and 20 μM , and a low-affinity system, with $K_m = 630 \mu\text{M}$.

In addition to a neurotransmitter role, EAA exert a toxic action at high concentrations, mainly on mature neurons (Baudry et al., 1983). More recent data indicate that these compounds

are required as trophic agents during development (Mattson et al., 1988; Brewer and Cotman, 1989). In order to subserve any of these functions, a precise regulation of the extracellular concentration of EAA becomes necessary. Hence, changes in the biochemical and pharmacological characteristics of the uptake system during development could participate in this regulation. In this study we have characterized the uptake of $^3\text{H-D-Asp}$ in progressive stages of in vitro development of neuron- and glial cell-enriched primary cultures from chick retina.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Fertilized eggs from local strain chicks were purchased from Armour Hatchery, SA de CV (Mexico). Disposable plasticware for tissue culture was from Nunc (Denmark). Dulbecco's Modified Eagle Medium, Fetal Bovine Serum, and PSN Antibiotic Mixture were from Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA). Rabbit immunoglobulins against neuron-specific enolase were from Dakopatts (Denmark). D-[2,3- ^3H] Aspartic acid (27 Ci/mmol) was from Amersham Searle (Buckinghamshire, UK). Specific excitatory amino acid analogues were from Tocris Neuramin (Essex, UK). All other chemicals and reagents were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA).

Retinal cultures. Retinal cultures were set as described by Adler et al. (1982). Briefly, retinas were obtained from 7 day old chicken embryos, incubated 20 min at 37°C in 0.25% trypsin in Ca^{++} and Mg^{++} -free Hanks balanced salt solution (Hanks-BSS) and mechanically dissociated. Plating was done at low density (1 X

10⁶ cells/dish) on poly-D-lysine coated 60 mm petri dishes for neuron-enriched cultures, and at high density (3 X 10⁶ cells/dish) on untreated 60 mm petri dishes for flat cell-enriched cultures, which in the chick retina are considered to be exclusively Müller cells (Moscona, 1983). Cells were grown in D-MEM + 10% fetal calf serum (FCS). In neuron-enriched cultures, AraC was added to a final concentration of 10⁻⁵M at 5 days in vitro and removed after 24 h., to avoid proliferation of dividing cells. The purity of the cultures was assessed by immunofluorescence using polyclonal antibodies against neuron-specific enolase (Schmechel et al., 1980) and GFAP (Björklund et al., 1985), and found to be > 95% in both types of cultures.

Uptake receptors. Uptake experiments were carried out on cultures of 1, 5, 8 and 12 days in vitro (DIV) as follows: while still attached to petri dishes, cells were washed twice with Hanks-BSS and incubated with 2 ml of Krebs Ringer-bicarbonate (NaCl 118mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.3mM, MgSO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 10 mM & glucose 5.6mM, pH 7.4) at 37°C for 3 min. A mixture of ³H-D-Asp and D-Asp (1:50) was added to a final concentration of 250 nM and cells were incubated for 10 additional min., after which medium was aspirated and cells were washed twice with cold Krebs. Cells were detached with a rubber policeman, transferred to vials, and counted for radioactivity after the addition of 5 ml Tritosol (Fricke, 1975). Corrections were made for quenching and counting efficiency. Protein was determined by the method of Lowry et al. (1951).

RESULTS

Development of retinal neurons and glia in culture.

Figure 1 shows neuron- and glial cell-enriched retinal cultures at undifferentiated (1 DIV) and differentiated (5 DIV for neurons and 8-12 DIV for Müller cells) stages. Neurons were considered morphologically differentiated at 5 DIV since most cells had extended neurites and contacts had been established. Moreover, Grosse et al. (1987) have demonstrated that structurally mature synapses as assessed by electron microscopy, are first found at this age in retinal cultures. Glial cell cultures were considered morphologically mature at 8-12 DIV, when confluence was reached. At this stage, glial cultures were 100% pure, as shown by immunocytochemistry.

General characteristics of ^3H -D-Asp uptake.

^3H -D-Asp uptake in both types of cultures was found to be Na^+ - and temperature-dependent (Fig. 2) since the first day in vitro (DIV). Time course of D-Asp accumulation was followed from one to 45 min. As can be seen in Fig. 3, at all ages studied equilibrium was reached at 10 min incubation; therefore, all further experiments were performed at this time.

Kinetics of ^3H -D-Asp uptake in neuron- and glia-enriched cultures

1. Neuron-enriched cultures. ^3H -D-Asp saturation curve within a concentration range of 10 to 1000 μM (Fig. 4) showed a single high-affinity, saturable uptake system at all ages studied, with $K_m = 7.9 \mu\text{M}$ at 1 DIV, and 13.03 μM at 5 and 8 DIV. A ten-fold increase in the capacity of the uptake system was observed

between days 1 and 5 in vitro: from $V_{max} = 2.9$ nmol/mg prot/10 min at 24 hs, to 23.96 nmol/mg prot/10 min at day 5 in vitro. At this stage, the uptake system seems to reach its final kinetic properties since there were no further changes in K_m or V_{max} up to 8 DIV, time at which neurons are considered mature regarding shape and physiological properties (Wahl et al., 1989).

2. Glial cell-enriched cultures. Müller cells show a low affinity 3H -D-Asp uptake system with a $K_m = 100-134$ μM at all ages studied (Fig. 4). An age-dependent increase in the V_{max} of the system was observed which peaked at 8 DIV ($V_{max} = 215$ nmol/mg prot/10 min), and progressively decreased to the value seen at 5 DIV (100 nmol/mg prot/10 min).

Pharmacology and energy-dependence of 3H -D-Asp uptake in neuronal and glial cultures.

Compounds known to act as competitive inhibitors of 3H -D-Asp uptake in other systems (L-glutamate, L-aspartate, D-glutamate, dihydrokainic acid, glutamic acid-4-monohydroxamate, and DL-aspartate- β -hydroxamate), competitive inhibitors of 3H -Glu binding to different postsynaptic EAA receptor types (GDEE, APV, and APB) as well as other non neuroactive L-amino acids (L-leucine and L-lysine), were tested at a concentration of 500 μM for their ability to inhibit 3H -D-Asp uptake in immature (1 DIV) and mature (8 DIV) retinal cultures (Table 1). Among these, only L-Glu, L-Asp and DL-Asp- β -hydroxamate showed a significant inhibition of uptake in both types of cultures. Regarding the efficiency of these compounds, no change was apparent in glial cells between 1 and 8 DIV, whereas in neurons, a slight increase

with increasing age was observed (Table 1). As for the potency of these inhibitors (Table 2), an opposite change in neurons and glial cells was found during in vitro development: whereas in neurons there was a decrease in the IC_{50} values (mainly for L-glu) from day 1 to day 8 IV, in glial cells the potency of L-Glu, L-Asp and DL-Aspartate- β -hydroxamate decreased 50% from DIV 1 to DIV 8.

Inhibitors of energy metabolism significantly decreased 3H -D-Asp accumulation: ouabain $10^{-4}M$ showed maximal inhibition (34%) in 8 DIV neuronal cultures as well as in 1 DIV Müller cell-cultures. 2,4-DNP showed a similar inhibition pattern, being more potent in mature neurons and immature glial cells (Table 3). These results suggest that in neurons, the energy requirement for uptake increases with age, whereas in glial cells uptake seems to become independent of the cell energetic state as confluence is reached.

DISCUSSION

The present findings support the idea that in the retina, as well as in other regions of the CNS, the appearance of the high-affinity uptake system for excitatory amino acids is an early event in development. EAA uptake has been characterized in diverse preparations as rat brain synaptosomes (Logan and Snyder, 1972), rat retina (White and Neal, 1976), and retinal synaptosomal fractions (Thomas and Redburn, 1978). In all cases, a low-affinity ($K_m \approx 100 \mu M$) and a high-affinity component ($K_m \approx 25 \mu M$) were found. Data in this paper show similar values for glia and neurons respectively, and hence suggest that systems

characterized in whole retina could correspond to the uptake into glial cells and neurons. An electrogenic glutamate transport has been described in an electrophysiological preparation of Muller cells from tiger salamander (Barbour et al., 1988) and axolotl retina (Brew and Attwell, 1987); this process is absolutely dependent on the presence of Na⁺, inhibited by p-chloromercuriphenylsulphonate, and shows a K_m in the range of 5 to 30 μM. We were unable to detect this system using a biochemical assay, which could derive from using D-Asp as a marker, since the electrogenic uptake system shows a high degree of stereospecificity for L- isomers of Glu and Asp. Alternatively, the possibility exists of this carrier not working in our preparation, since it is voltage-dependent, and membrane potential was not determined in the cultures.

In neuronal cultures, a ten fold increase in V_{max} was observed from the first to the fifth DIV, remaining constant thereafter (Fig. 4). In glial cultures a transient increase in V_{max} (from 104 to 215 nmol/mg prot/10 min) was observed at day 8 in which an increase in glutamate receptors has previously been reported (Somohano and Lopez Colome, 1987). A similar increase in the capacity of the uptake system has been reported in the hippocampus, the time course of which parallels that of synaptogenesis (Schmidt and Wolf, 1988). In brain synaptic vesicles, a ten-fold increase in glutamate uptake has also been shown between postnatal days 10 and 30, associated to the active period of synapse formation (Kish et al., 1989). In retinal cultures, the onset of synaptogenesis has been shown to occur at day five in vitro (Grosse et al., 1987), which correlates with

the observed rise in the capacity of the uptake system both in neurons and glial cells at this stage (Fig. 4).

Besides its proposed role as a classical neurotransmitter or as a neurotoxin, a role for glutamate as a trophic factor in critical stages of development has also been demonstrated (Mattson and Kater, 1989; Brewer and Cotman, 1989; Burgoyne and Cambray-Deakin, 1988). The extracellular concentration of excitatory amino acids (EAA) required for exerting a transmitter function or a trophic role during development differs in magnitude from nanomolar (Foster and Fagg, 1984) to micromolar (Brewer and Cotman, 1989), respectively. Hence, once the critical developmental period in which glutamate could exert a trophic action has ended, an excessive concentration of this amino acid would induce excitotoxicity. The low capacity of the uptake system both in glia and neurons previous to synaptogenesis and its forward increase after connections have been established, suggests that uptake mechanisms could be involved in the regulation of extracellular EAA concentrations during development, which is required for these compounds to exert a role as trophic factors, classical neurotransmitters, or excitotoxins in restricted periods of neuronal differentiation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Ms. Magdalena Sotelo for her technical assistance, as well as Lic. A. Rosado for providing a constant supply of fertilized eggs. This work was supported in part by CONACyT, grant P228CCOX-891617 to A.M.L.C.

REFERENCES

Adler R, Magistretti PJ, Hyndman AG, Shoemaker WJ (1982): Purification and cytochemical characterization of neuronal and non neuronal cells in chick embryo retina cultures. *Dev. Neurosci.* 5: 27-39.

Balcar VJ, Johnston GAR (1972): The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *J. Neurochem.* 19: 2657-2666.

Barbour B, Brew H, Attwell D (1988): Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 335: 433-435.

Baudry M, Kramer K, Lynch G (1983): Classification and properties of acidic amino acid receptors in hippocampus III. Supersensitivity during the postnatal period and following denervation. *Mol. Pharmacol.* 24: 229-234.

Björklund H, Bignami A, Dahl D (1985): Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Müller glia and retinal astrocytes. *Neurosci. Lett.* 54: 363-368.

Bondy S, Purdy J (1977): Putative neurotransmitters of the visual pathway. *Brain Res.* 119: 417-426.

Brew H, Attwell D (1987): Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature* 327: 707-709.

Brewer CJ, Cotman CW (1989): NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 99: 268-274.

Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA (1988): The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res. Revs.* 13: 77-101.

Casper D, Trelstad R, Reif-Lehrer L (1980): Initial effect of glutamate on cultured chick retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. Suppl.*: 184.

Cervetto L, MacNichol EF (1972): Inactivation of horizontal cells in turtle retina by glutamate and aspartate. *Science* 178: 767-768.

Ehinger B (1977): glial and neuronal uptake of GABA, glutamic acid, glutamine and glutathione in the rabbit retina. *Exp. Eye Res.* 25: 221-234.

Ehinger B, Falck B (1971): Autoradiography of some suspected neurotransmitter substances: GABA, glycine, glutamic acid,

histamine, dopamine and L-dopa. Brain Res. 33: 157-172.

Foster AC, Fagg GE (1984): Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. Brain Res. Rev. 7: 103-164.

Fricke V (1975): Tritosol: A new scintillation cocktail based on Triton-X-100. Anal. Biochem. 63: 555-558.

Grosse G, Wenzel M, Lindner G, Meyer U. (1987). Scanning EM observations on retina cells in culture. J. Hirnforsch 28(5): 479-485.

Hampton CK, Redburn DA (1983): Autoradiographic analysis of ³H-glutamate, ³H-dopamine and ³H-GABA accumulation in rabbit retina after kainic acid treatment. J. Neurosci. Res. 9: 239-251.

Hyndman AG, Adler R (1982): Analysis of glutamate uptake and monosodium glutamate toxicity in neural retina monolayer cultures. Dev. Brain Res. 2: 303-314.

Kish PE, Kim SY, Ueda T (1989). Ontogeny of glutamate accumulating activity in rat brain synaptic vesicles. Neurosci. Lett. 27: 185-190.

Logan WJ, Snyder SH (1971): Unique high affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in central nervous tissue of the rat. Nature 234: 297-299.

Logan WJ, Snyder SH (1972): High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. Brain Res. 42: 413-431.

Lowry OH, Rosenbrough WJ, Fatt AL, Randall RS (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol Chem. 193: 265-275.

Lund Larsen R (1978): The toxic effect of sodium glutamate and DL- α -amino adipic acid on rat retina: changes in high affinity uptake of putative transmitters. J. Neurochem. 31: 1055-1061.

Marc RE, Lam DM (1981): Uptake of aspartic and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 78(11): 7185-7189.

Mattson MP, Kater SB (1989): Excitatory and inhibitory neurotransmitters in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. Brain Res. 478: 337-348.

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

Schmechel DE, Brightman MW, Marangos PJ (1980): Neurons switch from non-neuronal to neuron-specific enolase during

differentiation. Brain Res. 190: 195-214.

Schmidt W, Wolf G (1988): High-affinity uptake of L-[³H]glutamate and D-[³H]aspartate during postnatal development of the hippocampal formation: a quantitative autoradiographic study. Exp. Brain Res. 70: 50-54.

Somohano F, Roberts PJ, Lopez Colome AM (1988): Maturation changes in retinal excitatory amino acid receptors. Dev. Brain Res. 42: 59-67.

Sugawara K, Negishi K (1973): Effects of some amino acids on the horizontal cell membrane potential in the isolated carp retina. Vision Res. 13: 2479-2489.

Sugiyama K, Brunori A, Mayer ML (1989): Glial uptake of excitatory amino acids influences neuronal survival in cultures of mouse hippocampus. Neurosci. 32(3): 779-791.

Thomas TN, Redburn DA (1978): Uptake of ¹⁴C-aspartic acid and ¹⁴C-glutamic acid by retinal synaptosomal fractions. J. Neurochem. 31: 63-68.

Wahl P, Schousboe A, Honore T, Drejer J (1989): Glutamate-induced increase in intracellular Ca⁺⁺ in cerebral cortex neurons is transient in immature cells but permanent in mature cells. J. Neurochem. 53(4): 1316-1319.

White RD, Neal MJ (1976): The uptake of L-glutamate by the retina. Brain Res. 111: 79-93.

TABLE 1
PHARMACOLOGY OF $^2\text{H-D-ASP}$ UPTAKE

$^3\text{H-D-Asp}$ UPTAKE (pmol/mg prot/10 min)

ANALOGUE	NEURONS		GLIA	
	1 DIV	8 DIV	1 DIV	8 DIV
Control	149	183	130	361
L-Aspartate	28	19	9	29
L-Glutamate	31	24	12	32
DL-Asp- β -hydroxamate	54	37	40	134
Glu-4-monohydroxamate	139	123	105	317
Dihydrokainate	118	141	100	274
D-Glutamate	128	143	101	332
Glutamate diethyl ester	113	124	113	307
D,L-2-amino-5-phosphono- valeric acid	122	172	122	310
D,L-2-amino-4-phosphono- butyric acid	134	167	112	336
L-Leucine	122	174	124	361
L-Lysine	132	168	117	339

Inhibition of $^3\text{H-D-Asp}$ uptake by 500 μM of uptake inhibitors (first 6 analogues), postsynaptic EAA-receptor blockers (GDEE, APV and APB), and other amino acids (L-Leu and L-Lys). Data are the mean of 3-5 experiments (performed in triplicate) with varied less than 10%.

TABLE 2

IC₅₀ of ³H-D-ASP UPTAKE INHIBITORS

ANALOGUE	IC ₅₀ (μM)			
	NEURONS		GLIA	
	1 DIV	8 DIV	1 DIV	8 DIV
L-Aspartate	22	19	21	52
L-Glutamate	45	21	27	71
DL-Asp-β-hydroxamate	89	70	155	224

IC₅₀'s for the most potent inhibitors of ³H-D-Asp uptake were determined graphically in a concentration range from 1 to 500 μM. Results are the mean of 3 separate experiments performed in triplicate.

TABLE 3
EFFECT OF METABOLIC INHIBITORS ON $^3\text{H-D-ASP}$ UPTAKE

$^3\text{H-D-Asp}$ UPTAKE (pmol/mg prot/10 min)

INHIBITOR	NEURONS		GLIA	
	1 DIV	8 DIV	1 DIV	8 DIV
control	149 \pm 10	179 \pm 3	141 \pm 17	297 \pm 2
ouabain 10^{-4}M	119 \pm 10	138 \pm 10	93 \pm 10	251 \pm 11
2,4-DNP $5 \times 10^{-5}\text{M}$	128 \pm 13	137 \pm 15	97 \pm 5	278 \pm 8

Cells were preincubated for 10 min in the absence (control) or presence of the stated concentration of inhibitors after which $^3\text{H-D-Asp}$ (250 nM) was added and incubation was continued for a further 10 min period. Results are the mean \pm S.E.M. of 3 separate experiments performed by triplicate.

FIGURE LEGENDS.

- FIGURE 1. Neuron- (A,B) and Müller cell- (C,D) enriched cultures at 1 DIV (A,C) and morphologically differentiated stages: 5 DIV for neurons (B) and 12 DIV for glia (D). Calibration bar = 25 μ M.
- FIGURE 2. Na^+ - and temperature-dependence of ^3H -D-Asp uptake. To test Na^+ -dependence, ^3H -D-Asp uptake was measured using Tris-Krebs in which Choline Chloride 118 mM substituted NaCl, at 37°C. For temperature-dependence, cells were incubated in Krebs Ringer Bicarbonate at 4°C. Results are the mean \pm S.E.M. of three separate experiments performed in triplicate.
- FIGURE 3. Time course of ^3H -D-Asp uptake. Cells were incubated for 1, 5, 10, 30 or 45 min. in the presence of 250 nM of ^3H -D-Asp. D-Asp uptake is expressed in nmol/mg prot for glial cells (right), and pmol/mg prot for neurons (left). Results are the mean \pm S.E.M. of 3 experiments performed in triplicate.
- FIGURE 4. Kinetics of ^3H -D-Asp uptake. Saturation curves were performed in a saturation range of 1 μ M to 1 mM. For neurons (left): at 1 DIV (\bullet) $K_m = 7.9 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 2.9 \text{ nmol/mg prot/10 min}$; at 5 (\square) and 8 (\circ) DIV $K_m = 13.03 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 23.96 \text{ nmol/mg prot/10 min}$. For glial cells (right): at 1 DIV (\bullet) $K_m = 101.9 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 40.9 \text{ nmol/mg prot/10 min}$; at 5 DIV (\square) $K_m = 100.1 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 103.7 \text{ nmol/mg prot/10 min}$; at 8 DIV (\circ) $K_m = 134 \mu\text{M}$,

Vmax = 215 nmol/mg prot/10 min; and at 12 DIV (●) Km = 134 μM, Vmax = 118 nmol/mg prot/10 min. Results are the mean ± of 3 separate experiments (in triplicate) which varied less than 10%.

FIGURE 1

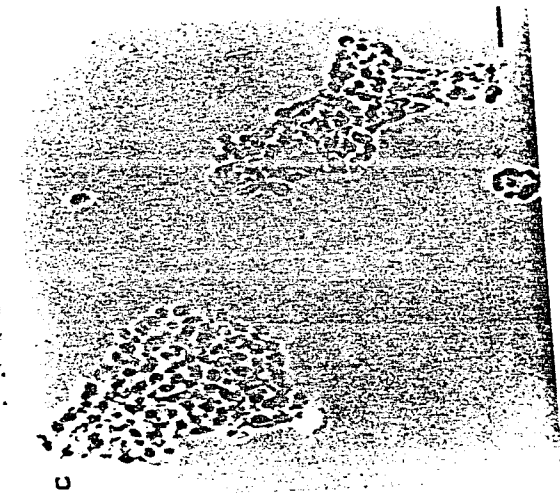
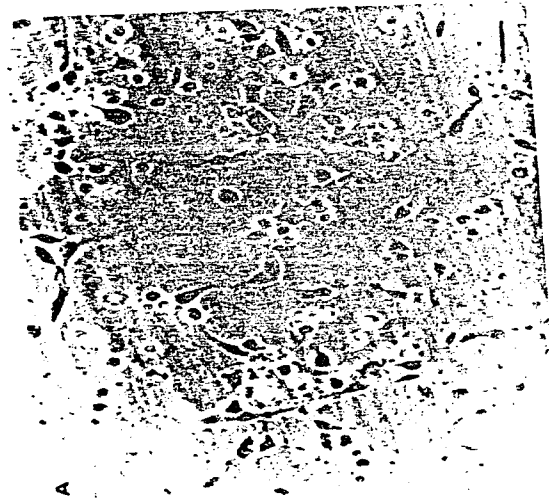
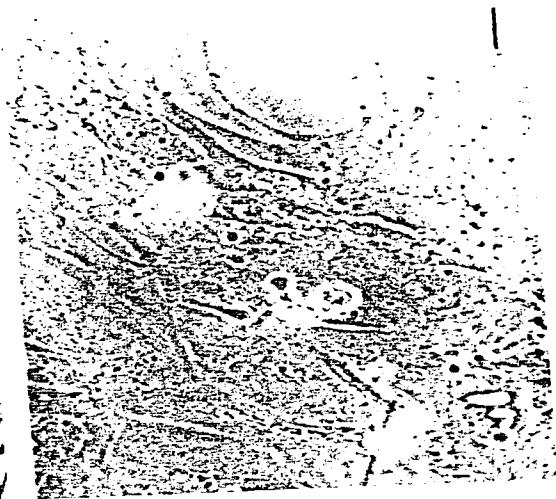
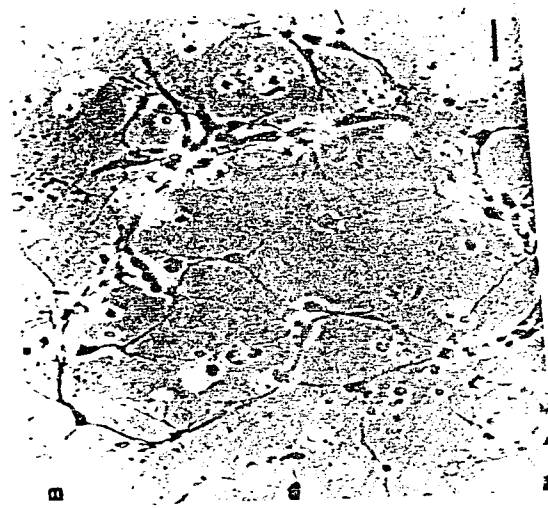
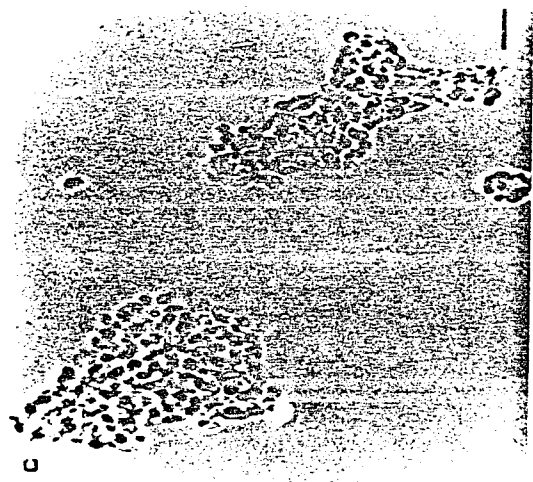
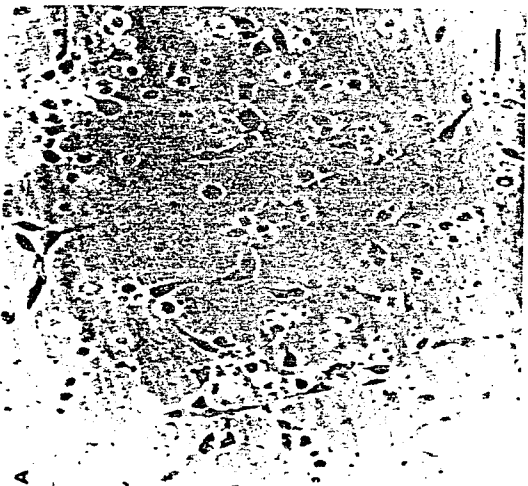
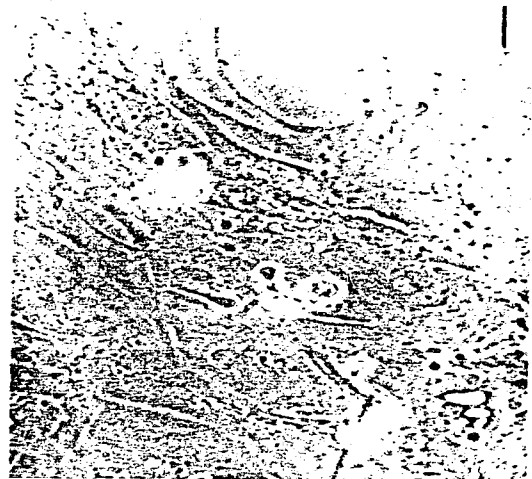
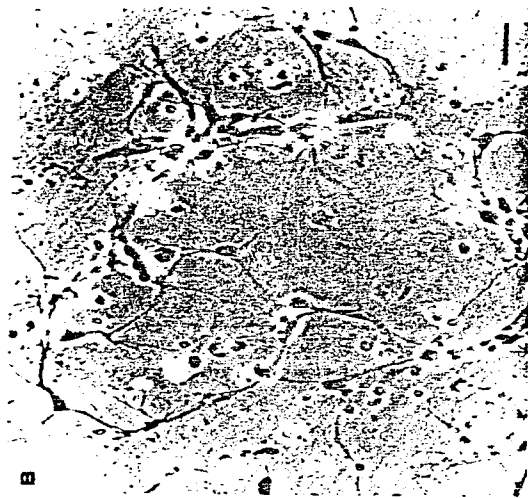
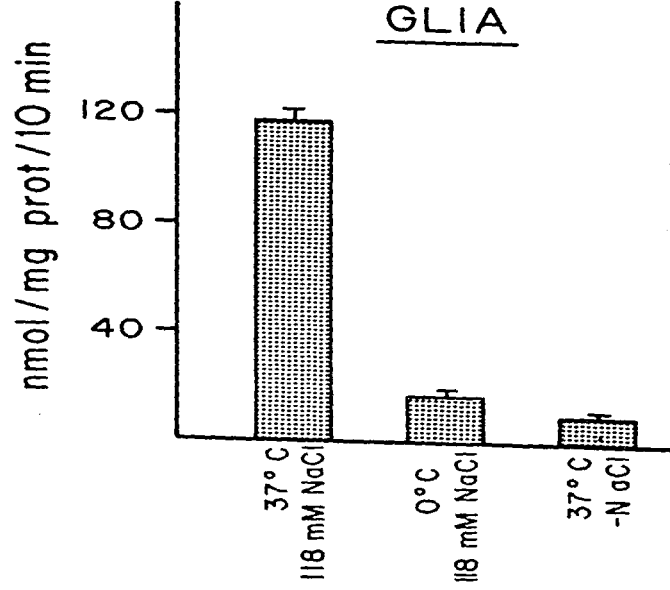
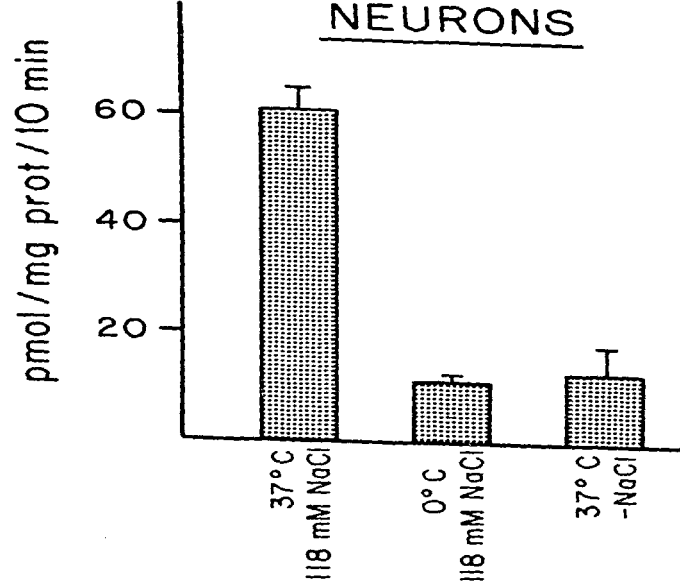


FIGURE 1





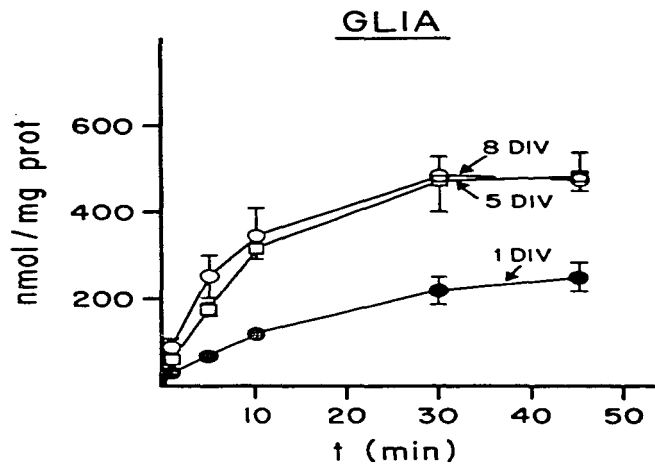
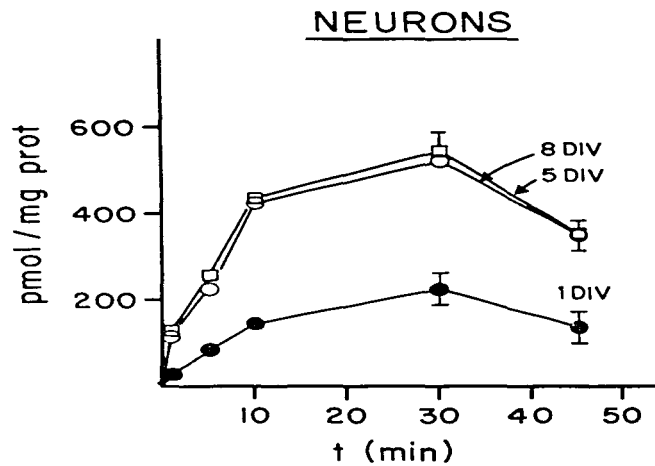
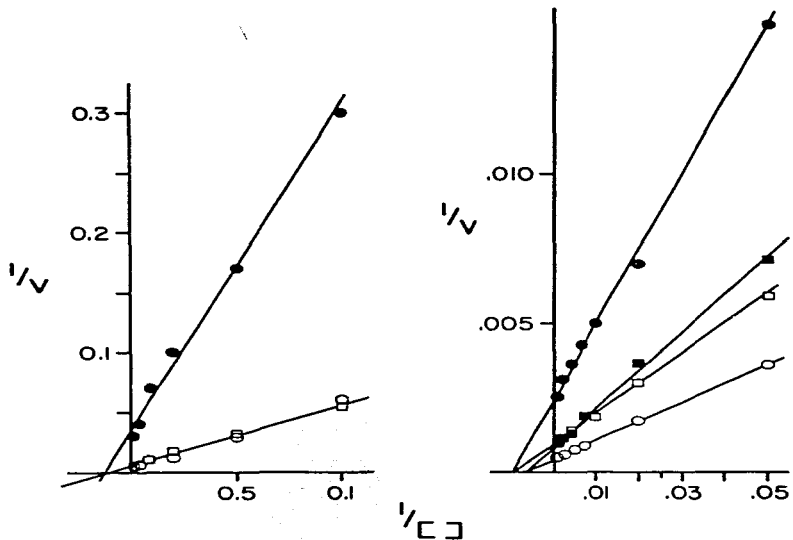
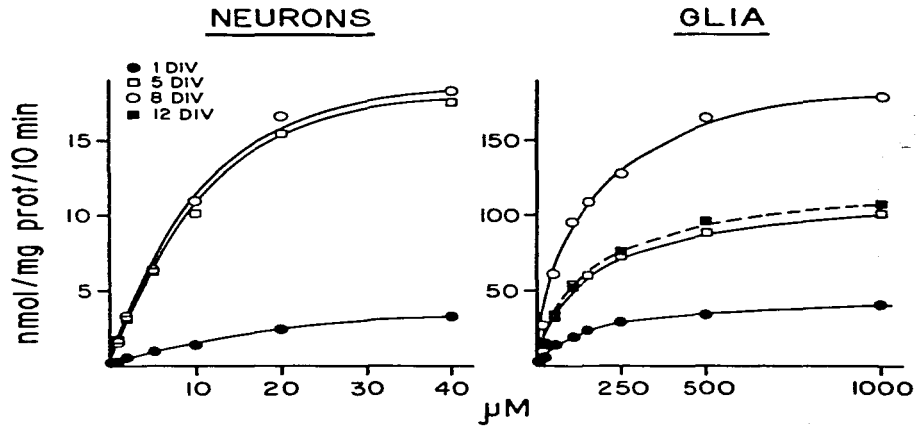


FIGURE 4



DISCUSION GENERAL

El objetivo general de estos estudios fue estudiar los cambios que sufren los componentes del sistema de neurotransmisión de los AAE en la retina durante el desarrollo y diferenciación de la misma. El conocer estas modificaciones nos llevaría a su vez a determinar cómo y en que momento se lleva a cabo el control de la concentración extracelular de glutamato, ya que de ésta depende, en gran medida, que el Glu tenga efectos neurotóxicos, tróficos, o de neurotransmisor clásico. Con este propósito se trató de establecer un paralelo entre la maduración de los receptores de captación, que eliminan al glutamato del medio extracelular, los receptores presinápticos, a través de los cuales se modula la liberación de Glu, y los receptores sinápticos, a través de los cuales se despolarizan la mayor parte de las células en respuesta a los AAE.

I. CORRELACION ENTRE LOS ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO.

Los estudios en retina de embriones demostraron que los receptores para AAE modifican sus características bioquímicas y farmacológicas y su proporción relativa a lo largo de la diferenciación celular, al igual que sucede en otras regiones del SNC (Mori-Okamoto e Ikeda, 1986). Los estudios en cultivos enriquecidos en neuronas o células gliales de la retina nos permitieron localizar con mayor precisión los receptores que aparecen en distintos momentos de la diferenciación. Al correlacionar estos resultados con los cambios que sufren los receptores in vivo, nos permiten contar con un modelo en el cual

estudiar los mecanismos que podrían inducir dichos cambios. A pesar de que in vivo existen factores extracelulares que determinan la maduración tanto morfológica como bioquímica de las células, que podrían no estar presentes en los cultivos, esta correlación es posible en cierto grado ya que existe evidencia de que la diferenciación de las células de la retina en cultivo sigue un curso temporal paralelo al que tiene in vivo. Así, por ejemplo, Grosse et al. (1987) demostraron que las primeras sinapsis se establecen en neuronas de retina en cultivo a los 5 DIV, al igual que en los embriones de edad correspondiente; Zeevalk y Hyndman (1986) demostraron que la proporción de células amacrinas que se diferencian en cultivo equivale a la de células amacrinas in vivo; los astrocitos en cultivo desarrollan características electrofisiológicas (Kimmelberg et al., 1979) y morfológicas (Juurink y Hertz, 1985) similares a las que presentan in vivo, etc. Nuestras conclusiones, por lo tanto, se basan en el conjunto de resultados obtenidos tanto en el sistema in vivo, como en los cultivos.

II. RECEPTORES PARA AAE EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DE.

Al principio del desarrollo, los receptores sinápticos son altamente inespecíficos y presentan características tanto de los receptores tipo NMDA como de los NO-NMDA, ya que interactúan con el L-Asp y con AMPA. Sin embargo, y a pesar de esta inespecificidad farmacológica, entre los días 7 y 8 DE es posible identificar tres poblaciones distintas de receptores: a) en los embriones de 7 DE, un receptor de alta afinidad ($K_B = 0.56 \mu M$) que une 3H -AMPA, que podría corresponder a una población de receptores presinápticos a través de los cuales el ácido kaínico

podría potenciar la liberación del transmisor (ver p.89); b) una población muy pequeña de receptores de alta afinidad para $^3\text{H-Asp}$ ($K_B = 33-40 \text{ nM}$), la cual probablemente también une al $^3\text{H-AMPA}$, aunque con baja afinidad, que se localizó en las neuronas en cultivo y que podría corresponder a los primeros receptores postsinápticos; y c) una población que une $^3\text{H-Asp}$ con menor afinidad que la anterior ($K_B = 0.2-0.4 \mu\text{M}$), que se localiza tanto en las neuronas como en las células gliales en cultivo y que podría representar los sitios de captación.

En esta etapa los sitios de captación tanto en las neuronas como en las células gliales se encuentran ya diferenciados: presentan la farmacología típica de estos sitios y su afinidad por el D-Asp no cambia significativamente durante la diferenciación, aunque su número es bajo. Desde el primer DIV, la captura del aminoácido depende en más de un 75% de Na^{++} y de temperatura. A esta edad (7 y 8 días DE) encontramos en los embriones la máxima liberación de AAE por despolarización con alto potasio, y esta liberación es independiente de la presencia de Ca^{++} en el medio de estimulación.

III. RECEPTORES PARA AAE EN ETAPAS INTERMEDIAS DEL DE.

Entre los días 11 y 14 DE se hace aparente una nueva población de sitios de unión para $^3\text{H-Glu}$ en los embriones. Estos receptores podrían localizarse en las células horizontales y bipolares puesto que se ha demostrado que en esta etapa se inicia su diferenciación. Al igual que las poblaciones de receptores identificadas en etapas previas, esta también muestra inespecificidad farmacológica aunque sus características

cinéticas corresponden a las de la unión de $^3\text{H-Glu}$ en la retina de los pollos adultos. En los cultivos de neuronas de edad equivalente (5-8 DIV) persisten las dos poblaciones de receptores de $^3\text{H-Asp}$ descritas anteriormente. En este período se presenta un cambio en cuanto a las propiedades de los receptores presinápticos, que pudiera ser a nivel del mecanismo de transducción de la señal. Esto se deduce del hecho de que a partir de esta etapa la interacción de los AAE con estos receptores inhibe la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ estimulada por despolarización en la retina completa de embriones. La liberación de D-Asp estimulada por alto potasio disminuye con respecto a los días 7-8 DE a la vez que adquiere dependencia de Ca^{++} . La adquisición de la dependencia de Ca^{++} coincide en el tiempo con la aparición de las vesículas sinápticas en la CPI de la retina. Esta observación podría sugerir, que mientras que la liberación dependiente de calcio está en función de la presencia de vesículas, la independiente podría proceder de una poza citoplásmica, probablemente relacionada con un intercambiador como se ha sugerido para el GABA (Levi y Raiteri, 1978). En cuanto a la captura de los AAE, en esta etapa se observa un incremento en la incorporación de $^3\text{H-D-Asp}$ tanto en los cultivos de neuronas como de glía, alcanzando en esta última su capacidad máxima a los 8 DIV (14 DE): $V_{\text{max}} = 215 \text{ nmolas/mg proteína/10 min.}$

IV. RECEPTORES PARA AAE EN ETAPAS TARDIAS DEL DE

Los receptores sinápticos medidos con $^3\text{H-L-Asp}$ en los embriones muestran, al día 18 DE, constantes cinéticas con valores muy cercanos a los obtenidos en la retina del pollo adulto, así como en los cultivos de células gliales de la edad

correspondiente (12 DIV): $K_{B1} = 123 \text{ nM}$ y $B_{max1} = 1.3 \text{ pmolas/mg}$ proteína; $K_{B2} = 1.86 \text{ }\mu\text{M}$ y $B_{max2} = 10.5 \text{ pmolas/mg}$ proteína) de manera que podría tratarse de los mismos receptores. Así, el aumento en la unión específica de $^3\text{H-Asp}$ que se observa en los embriones podría explicarse por la aparición del sistema de menor afinidad ($1.3\text{-}1.8 \text{ }\mu\text{M}$) en las células gliales diferenciadas, el cual podría representar sitios de captación (posiblemente electrogenica) de AAE (Brew y Attwell, 1987).

V. RECEPTORES PARA AAE EN LA ETAPA FINAL DEL DE

Entre los días 18 a 21 DE, suceden cambios importantes en los receptores sinápticos en los sitios de captación, y en la liberación de AAE. Así, los receptores sinápticos adquieren la especificidad farmacológica (NMDA o NO-NMDA) que permite distinguir sus diferentes subtipos. Los receptores de AMPA en los cultivos de células gliales se definen como receptores de tipo QA, mientras que los sitios de interacción del AMPA en las neuronas durante los primeros DIV se definen como de tipo NMDA. Durante este periodo es posible medir la unión de $^3\text{H-NMDA}$ en los embriones. Asimismo, se adquiere la capacidad de este compuesto para competir con el $^3\text{H-Asp}$ y para modular negativamente la liberación de $^3\text{H-D-Asp}$ en la CPI de la retina. En los embriones aumenta la sensibilidad de los receptores de tipo NMDA a los antagonistas y en las neuronas de 8 DIV el APV se vuelve el desplazador más potente del $^3\text{H-AMPA}$. En cuanto a la liberación de AAE, la espontánea aumenta durante este período, lo cual podría relacionarse con la despolarización necesaria, a nivel postsináptico, para la activación de los receptores de NMDA. La

activación de los receptores de NMDA podría estar relacionada, a su vez, con su maduración, y esto último con la activación de mecanismos que dependen de Ca^{++} , ya que es principalmente este subtipo de receptor el que se relaciona con la entrada de Ca^{++} durante la despolarización (Mayer y Westbrook, 1985).

Nuestros resultados tanto en retina completa durante el DE como durante la diferenciación in vitro en cultivos sugieren que los sitios de unión para 3H -KA no aparecen sino hasta el momento de la eclosión. Sin embargo, algunos autores afirman lo contrario, ya que durante el desarrollo embrionario de la retina, se ha visto que el ácido kaínico puede tener efectos neurotóxicos (Gibson y Reif-Lehrer, 1984). Como se dijo anteriormente, estos efectos podrían derivar de la interacción del ácido kaínico con los receptores presinápticos de AMPA, estimulando la liberación del transmisor, y no necesariamente a través del receptor postsináptico.

VI. "MODELO" DE LA EVOLUCION ONTOGENETICA DE LOS RECEPTORES PARA AAE

Los estudios anteriores nos permiten proponer un modelo para explicar la evolución ontogenética de los receptores para AAE y su participación en el desarrollo de la retina:

Etapas tempranas del DE (días 7-8 DE): Los primeros receptores para AAE aparecen en las células bipolares y son receptores presinápticos de tipo mixto AMPA/ KA/ASP. A través de éstos, el transmisor, probablemente el ácido aspártico, estimula su propia liberación independiente de Ca^{++} . Esto coincide con el hecho de que aún no aparecen las vesículas sinápticas ni sus precursores, las vesículas cubiertas. Estos receptores se inactivarían al día

8, paralelamente a la aparición de receptores postsinápticos para AMPA y Asp, posiblemente en las células ganglionares y amacrinas que extienden sus neuritas en ese período, así como en las células de Müller. En las neuronas parece existir un sólo tipo de receptor, poco diferenciado que acepta tanto al Asp como al AMPA, mientras que en la glía existen dos poblaciones, una de AMPA y otra de Asp que parece tener características típicas del receptor de NMDA.

La baja capacidad de los sistemas de captación, la más elevada liberación de AAE por despolarización durante el DE y su potenciación por de la estimulación de los receptores presinápticos, provocaría una elevación en la concentración del neurotransmisor en el medio extracelular. En estas condiciones, los AAE podrían ejercer una acción trófica sobre las células amacrinas y ganglionares, como se ha visto en otros sistemas en los que el glutámico detiene la ramificación de las neuronas y de la glía y promueve la diferenciación de las estructuras postsinápticas (Mattson et al., 1988).

Etapas intermedias del DE (días 9-11 DE): La sinaptogénesis en la CPI se inicia entre los días 9 y 10 DE, paralelamente al control de la concentración extracelular de AAE a través de tres mecanismos: a) el aumento en la capacidad de los sistemas de captación de los AAE (8 veces en las neuronas y 2.5 veces en la glía), b) una disminución importante en la liberación de D-Asp por despolarización, y c) la inhibición de esta liberación a través de receptores presinápticos con propiedades farmacológicas distintas a las de los postsinápticos y cuyos principales

agonistas son el APB y el APV. En este periodo aparecen los primeros receptores postsinápticos para L-Glu, probablemente en las células horizontales y bipolares, precediendo a la sinaptogénesis en la CPE.

Días 12-14 DE: El periodo de la sinaptogénesis en la CPE se inicia entre los días 12 y 13 DE. Coincidentemente, al día 14 aparecen los primeros sitios de unión para Asp en la CPE y/o en la glía y los receptores de Glu alcanzan la concentración y las características cinéticas del adulto. Concomitantemente, se observan cambios en los sistemas de captación tanto en la glía como en las neuronas; mientras que en éstas últimas el sistema adquiere especificidad farmacológica aumentando su afinidad por los inhibidores, en la glía la capacidad del sistema aumenta. En las células gliales los receptores de AMPA se definen claramente como de QA/KA. Durante este mismo periodo, en el que se observa la aparición de las vesículas sinápticas en la CPI, la liberación de D-Asp estimulada por K⁺ adquiere dependencia de Ca⁺⁺ en un 80%. Por otra parte, los receptores presinápticos adquieren especificidad farmacológica distinta de las etapas previas de DE (p. 89).

Etapas tardías del DE (días 15-18 DE): Las células de Müller alcanzan la CPE durante este periodo y completan su diferenciación morfológica y fisiológica, como lo confirma la aparición de la onda b del ERG (Rager, 1979). Asimismo, las terminales de los fotorreceptores se consideran maduras. La capacidad del sistema de captación en la glía se estabiliza en los valores previos al incremento observado el día 8 (14 DE). Por

otra parte, los receptores de ^3H -Asp alcanzan la concentración y las características cinéticas del adulto y adquieren especificidad farmacológica, en particular, sensibilidad al NMDA. Este hecho coincide con un aumento importante en la liberación espontánea de AAE. La maduración de los receptores y el aumento en la liberación, en conjunto, podrían jugar un papel importante en la despolarización de la membrana postsináptica necesaria para la activación de los receptores de NMDA, involucrados en cambios plásticos durante la diferenciación de ciertas vías sensoriales (Lincoln et al, 1986, Rauschecker y Hahn, 1987).

En las neuronas en cultivo, a los 8 DIV, el receptor AMPA/Asp se define como un receptor preferente para los antagonistas del NMDA, en el cual compete el AMPA, pero no el QA. Esto podría indicar que en las neuronas el receptor de QA es insensible al AMPA (como se ha propuesto para el receptor metabotrópico de QA), o bien los receptores de QA en la retina se localizan sólo en las células de Müller. En éstas últimas, a los 12 DIV, se distingue un sistema de unión de L-Asp de muy baja afinidad con características farmacológicas similares a las del de la captación electrogénica de glutamato que se ha identificado tanto en las células de Müller del ajolote, como en astrocitos (Brew y Attwell, 1987).

Al final del desarrollo embrionario, entre los días 19 y 21, aparece la barrera hemato-retiniana y se completa la maduración de los segmentos externos e internos de los fotorreceptores. Asimismo, los receptores sinápticos para AAE, particularmente los de NMDA, adquieren sus características farmacológicas definitivas. El momento de la eclosión va acompañado de cambios

bioquímicos en la retina posiblemente inducidos por la luz. Entre ellos se encuentra un aumento importante en la concentración de AMPc (Fletcher y Chader, 1978), la expresión del proto-oncogen c-fos (Sagar y Sharp, 1990) y la aparición del subtipo de receptores para AAE que une preferentemente ácido kaínico (Somohano et al., 1988).

Los resultados anteriores indican que los receptores para AAE, al momento de su aparición en el desarrollo ontogenético, muestran cierta inespecificidad farmacológica ya que interactúan con agonistas y antagonistas de los diferentes subtipos caracterizados en el adulto. Esto podría apoyar la idea de que, a nivel molecular, varios de estos receptores provinieran de la expresión de un mismo gen y que por variaciones en el ambiente iónico o en el entorno lipídico adquirieran las características de los diferentes subtipos en los animales adultos. Una posible excepción serían los receptores de KA que no se expresan sino hasta después de la eclosión. Recientemente, Hollman et al. (1989) lograron clonar el gen de un receptor que, al expresarse en oocitos de *Xenopus*, presenta las características del receptor de KA. Esto podría indicar que se trata de una proteína independiente de los demás subtipos. Si este fuera el caso, el receptor QA/KA que se ha descrito en el SNC, tendría que explicarse a través de la interacción, ya sea directa o mediada por mensajeros intracelulares, de dos receptores distintos. A este respecto, O'Dell y Christensen (1989), al estudiar la respuesta de las células horizontales de la retina a los AAE, propusieron un modelo que podría explicar esta interacción. De

acuerdo con éste, la unión del kainato a su sitio produciría un cambio conformacional del receptor QA/AMPA de manera que aumentaría la afinidad de este sitio tanto por estos agonistas como por el KA. Este modelo explicaría por qué el AMPA y el QA inhiben el efecto de concentraciones altas de KA, y la capacidad de éste, a concentraciones bajas, para aumentar las respuestas al QA y al AMPA. Los resultados de este trabajo apoyan este modelo ya que, si bien no es posible detectar receptores que unan KA con alta afinidad durante el desarrollo, el KA a concentraciones relativamente altas (1 mM) no sólo desplaza al ^3H -AMPA de sus sitios, sino que tiene un efecto potenciador sobre la liberación de AAE a una edad en que la única población de receptores detectable en la retina es la que une ^3H -AMPA.

Resumiendo, podemos concluir que durante el desarrollo ontogenético ocurre un ciclo en el que los cambios en las propiedades de los receptores para AAE podrían determinar variaciones en las concentraciones extracelulares de glutamato, que a su vez, podrían determinar modificaciones en las propiedades de los receptores o su activación. De esta manera, el efecto de los AAE como factores tróficos, como neurotransmisores o como agentes neurotóxicos dependería del balance, en distintos momentos, entre estos componentes.

CONCLUSIONES GENERALES

A partir de los resultados de este trabajo, las principales conclusiones son:

1. Los receptores para AAE en la retina modifican sus características cinéticas y farmacológicas, así como su distribución en las diferentes poblaciones celulares, a lo largo del desarrollo ontogenético.
2. Los diferentes subtipos de receptores para AAE se expresan en las células de la retina en cultivo y presentan características cinéticas y farmacológicas similares a las que presentan estos receptores durante el desarrollo embrionario. Esto sugiere que los cultivos de células disociadas de la retina podría ser un modelo adecuado para el estudio de los factores que determinan los cambios en las propiedades de los receptores para AAE. Sin embargo, también existen diferencias entre los estudios en los embriones y en los cultivos, principalmente en cuánto al curso temporal de aparición de los distintos subtipos de receptores, lo que hay que tener en consideración cuando se pretenda hacer extrapolaciones entre ambos sistemas.
3. La inespecificidad farmacológica de los receptores para AAE en etapas tempranas del desarrollo podría sugerir que los distintos subtipos de receptores provinieran de la expresión de un mismo gen. En este caso, su diferenciación posterior podría deberse a modificaciones en la composición de la membrana o en el entorno celular. Los receptores de tipo KA podrían ser una excepción, ya que sólomente se detectan después de la eclosión y podrían provenir de la expresión de un gen distinto.

4. La concentración extracelular de AAE podría ser más elevada en periodos previos al inicio de la sinaptogénesis. En esta etapa los AAE, al interactuar con receptores presinápticos, potencian la liberación y los sistemas de captación de estos aminoácidos son de baja capacidad. Esto permitiría que los AAE tuvieran efectos tróficos durante este periodo.

5. A partir del inicio de la sinaptogénesis aparece el control de la liberación de AAE por inhibición presináptica y aumenta la capacidad de los sistemas de captación. Esto podría contribuir a la disminución de la concentración extracelular de AAE, evitando así efectos neurotóxicos.

Las principales aportaciones de este trabajo son haber demostrado, por una parte, la "maduración" bioquímica de los distintos subtipos de receptores para AAE durante el desarrollo ontogenético de la retina, y, por otra, que el cultivo de células disociadas de la retina es un modelo adecuado para el estudio de algunos de estos cambios. Este trabajo sienta las bases para que, en estudios posteriores y utilizando los cultivos de neuronas o células gliales de la retina, se investigue qué tipo de factores: intrínsecos o extrínsecos, y a través de qué mecanismos, podrían determinar las modificaciones que sufren los receptores. Esto contribuiría de manera importante a entender la diferenciación celular a nivel bioquímico, y, por otra parte permitiría, tal vez, utilizar nuevos enfoques terapéuticos en aquellos casos en que la función de los receptores para AAE se encuentre alterada.

REFERENCIAS

- Adler, R. y M. Hatlee. (1989). Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. Science 243: 391-393.
- Adler, R., P.J. Magistretti, A.G. Hyndman y W.J. Shoemaker. (1982). Purification and cytochemical identification of neuronal and non-neuronal cells in chick embryo retina cultures. Dev. Neurosci. 5: 27-39.
- Anand, H., P.J. Roberts y A.M. López Colomé. (1985). Excitatory amino acids in the chick retina: possible involvement of cyclic guanosine monophosphate. Neurosci. Lett. 58:31-36.
- Arbilla, S., L. Kamal y S.Z. Langer. (1979). Pre-synaptic GABA autoreceptors on GABAergic nerve endings of the rat substantia nigra. Eur. J. Pharmacol. 57: 211-217.
- Assaf, S.Y. y S.H. Chung. (1984). Release of endogenous Zn^{++} from brain tissue during activity. Nature 308: 734-736.
- Axelrod, J., R.M. Burch y C.L. Jeselma. (1988). Receptor mediated activation of phospholipase A_2 via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. Trends in Neurosci. 11(3): 117-123.
- Balazs, R., O.S. Jorgensen y N. Hack. (1988). N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. Neurosci. 27(2): 437-451.
- Balcar, V.J., A. Schousboe, P.E. Spoerri y J.R. Wolff. (1987). Differences between substrate specificities of L-glutamate uptake by neurons and glia studied in cell lines and primary cultures. Neurochem. Int. 10(2): 213-217.
- Barbour, B., Brew, H. y D. Attwell. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. Nature 335: 433-435.
- Baudry, M., K. Kramer y G. Lynch. (1983). Classification and properties of acidic amino acid receptors in hippocampus III. Supersensitivity during the postnatal period and following denervation. Mol. Pharmacol. 24: 229-234.
- Bekkers, J.M. y C.F. Stevens. (1989). NMDA and NON-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. Nature 341: 230-233.
- Bertolino, M., S. Vicini, J. Mazzeta y E. Costa. (1988). Phencyclidine and glycine modulate NMDA activated high conductance cationic channels by acting at different sites. Neurosci. Lett. 84: 351-355.

- Bignami, A. (1984). Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. Brain Res. 300: 175-178.
- Bignami, A. y D. Dahl. (1979). The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. Exp. Eye Res. 28: 63-69.
- Bloomfield, G.A. y R. Miller. (1986). A functional organization of ON and OFF pathways in the rabbit retina. J. Neurosci. 6: 1-13.
- Bowman, C.L. y H.K. Kimelberg. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. Nature 311: 656-659.
- Brecha, N. (1983). Retinal neurotransmitters: histochemical and biochemical studies. En: Clinical Neuroanatomy (P.C. Emson, Ed). Raven Press, N.Y. p. 85-129.
- Brew, H. y D. Attwell. (1987). Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. Nature 327: 707-709.
- Brewer, G.J. y C.W. Cotman. (1989). NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. Neurosci. Lett. 99: 268-273.
- Butcher, S.P., J.F. Collins y P.J. Roberts. (1983). Characterization of the binding of DL-[³H]2-amino-phosphonobutyrate to L-glutamate sensitive sites on rat brain synaptic membranes. Br. J. Pharmacol. 80: 355-364.
- Cerrito, F. y M. Raiteri (1979a). Serotonin release is modulated by pre-synaptic autoreceptors. Eur. J. Pharmacol. 41: 600-606.
- Cerrito, F. y M. Raiteri. (1979b). Evidence for an autoreceptor-mediated pre-synaptic control of serotonin release in central nerve endings. Br. J. Pharmacol. 67: 424-425.
- Choi, D.W. (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. Neurosci. Lett. 58: 293-297.
- Coleman, P.A., S.C. Massey y R.F. Miller. (1986). Kynurenic acid distinguishes kainate and quisqualate receptors in the vertebrate retina. Brain Res. 381: 172-175.
- Contreras, P.C., D.A. Di'Maggio y T.L. O'Donohue. (1987). An endogenous ligand for the sigma opioid binding site. Synapse 1: 57-61.
- Costa, E., E. Fadda, A.P. Kozikowski, F. Nicoletti y J.T. Wroblewski. (1988). Classification and allosteric modulation of excitatory amino acid signal transduction in brain slices and primary cultures of cerebellar neurons. En: Neurobiology of amino acids,

peptides and trophic factors (Ferrendelli, J., R. Collins y E. Johnson, Eds.). Martinus Nighoff, Boston.

Cotman, C.W. y D.T. Monaghan. (1987). Chemistry and anatomy of excitatory amino acid systems. En: Psychopharmacology: the next generation of progress. (H.Y. Melter, Ed.). Raven Press, N.Y.

Cull-Candy, S.S. y M.M. Usowicz. (1987). Multiple conductance channels activated by excitatory amino acids in cerebellar neurons. Nature 325(6104): 525-528.

Dacheux, R.F., T.E. Frumkes y R.F. Miller. (1979). Pathways and polarities of synaptic interactions in the inner retina of the mudpuppy. I. Synaptic blocking studies. Brain Res. 161: 1-12.

De Langen, C.D.J., y A.H. Mulder. (1981). On the role of calcium ions in the pre-synaptic alpha-receptor mediated inhibition of ³H-noradrenaline release from rat brain cortex synaptosomes. Brain Res. 185: 399-408.

De Nardis, R., J. Sattayasai, J. Zappia y D. Ehrlich. (1988). Neurotoxic effects of kainic acid on developing chick retina. Dev. Neurosci. 10: 256-269.

Dowling, J.E. (1979). Information processing by local circuits: the vertebrate retina as a model system. En: The Neurosciences: Fourth Study Program (Schmitt, P.O. y F.G. Worden, Eds.). MIT Press, Cambridge, MA. p. 163-182.

Dowling, J.E. y H. Ripps. (1973). Effect of magnesium on horizontal cell activity in the skate retina. Nature 242: 101-103.

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

Dudel, J. y S.W. Kuffler. (1961). Pre-synaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. J. Physiol. (Lond) 155: 543-562.

Dumuis, A., M. Sebben, L. Haynes, J.P. Pin y J. Bockaert. (1988). NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. Nature 336: 68-70.

Dupont, J.L., R. Gardette y F. Crepel. (1987). Postnatal development of the chemosensitivity of rat cerebellar Purkinje cells to excitatory amino acids. An in vitro study. Dev. Brain Res. 34: 59-63.

Enna, S.J. y S.H. Snyder. (1976). Properties of γ -amino butyric acid (GABA) receptor binding in mammalian retina. Brain Res. 115: 174-179.

Fagg, G.E. y A. Matus. (1984). Selective association of N-methyl aspartate and quisqualate types of L-glutamate receptor with

brain postsynaptic densities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6876-6880.

Farnebo, L.O., y B. Hamberger. (1971). Drug induced changes in the release of ³H-monoamines from field stimulated rat brain slices. Acta Physiol. Scand. Suppl. 371: 35-44.

Fedoroff, S., J. Neal, M. Opas y V.I. Kalnins. (1984). Astrocyte cell lineage III. The morphology of differentiating mouse astrocytes in colony culture. J. Neurocytol. 13: 1-20.

Ferkany, J.W., R. Zaczek y J.T. Coyle. (1982). Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. Nature 298: 757-

Ferraro, T.W. y T.A. Hare. (1985). Free and conjugated amino acids in human CSF: influence of age and sex. Brain Res. 338: 53-60.

Fletcher, R.T. y G.J. Chader. (1978). Cyclic nucleotides and protein kinase systems in the developing chick retina and pigment epithelium. Biochim. Biophys. Acta 544: 45-52.

Foster, A.C. y G.E. Fagg. (1984). Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. Brain Res. Revs. 7: 103-164.

Foster, G.A. y P.J. Roberts. (1981). Kainic acid stimulation of cerebellar cyclic GMP levels: potentiation by glutamate and related amino acids. Neurosci. Lett. 23: 67-70.

Frederick, J.M. (1987). The emergence of GABA-accumulating neurons during retinal histogenesis in the embryonic chick. Exp. Eye Res. 45: 933-945.

Gershenfeld, H.M. y M. Piccolino. (1979). Pharmacology of the connections of cones and L-horizontal cells in the vertebrate retina. En: The Neurosciences: Fourth Study Program (Schmitt, P.O. y F.G. Worden, Eds.). MIT Press, Cambridge, MA. p.213-226.

Ghandour, M.S., O.K. Langley, G. Vincendon y G. Gombos. (1979). Double labeling immunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cell markers. J. Histochem. Cytochem. 27: 1634-1637.

Gibson, B.L. y L. Reif-Lehrer. (1984). In vitro effects of kainate on embryonic and posthatching chick retina. Dev. Brain Res. 15: 97-103.

Gibson, B.L., R. Schwarcz y L. Reif-Lehrer. (1985). Quinolinolate, a selective neurotoxin in embryonic and posthatching chick retinas. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 26: 50-57.

Gthert, M. (1980). Serotonin receptor-mediated modulation of Ca⁺⁺-dependent 5-hydroxytryptamine release from neurones from the rat brain cortex. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 314:

Gthert, M. y E. Wehking. (1980). Inhibition of Ca^{++} -induced noradrenaline release from central noradrenergic neurons by morphine. Experientia 36: 239.

Grothe, C. y K. Unisicker. (1988). Reciprocal age-dependent pattern of two neuronal markers, tetanus toxin and neuron-specific enolase, in postnatal rat sensory and sympathetic neurons. Dev. Brain Res. 39: 1-8.

Grosse, G., M. Wenzel, G. Lindner y U. Meyer. (1987). Scanning EM observations on retina cells in culture. J. Hirnforsch. 28(5): 479-485.

Hagins, W.A. (1979). Excitation in vertebrate photoreceptors. En: The Neurosciences: Fourth Study Program (Schmitt, P.O. y F.G. Worden, Eds.). MIT Press, Cambridge, MA. p. 183-192.

Hahn, J.S., E. Aizenman y S.A. Lipton. (1988). Central mammalian neurons normally resistant to glutamate toxicity are made sensitive by elevated extracellular Ca^{++} : toxicity is blocked by the N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 6556-6560.

Hamburger, V. y H.L. Hamilton. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morphol. 88: 49-92.

Harris, K.M. y R.J. Miller. (1989). EAA-evoked release of 3H -GABA from hippocampal neurons in primary culture. Brain Res 482(1): 23-34.

Herz, L. (1979). Functional interactions between neurons and astrocytes. I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. Prog. Neurobiol. 13: 277-323.

Hinds, J.W. y P.L. Hinds. (1978). Early development of amacrine cells in the mouse retina: an electron microscopic, serial section analysis. J. Comp. Neurol. 179: 277-300.

Hollman, M., A. O'Shea-Greenfield, S.W. Rogers y S. Heinemann. (1989). Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. Nature 342: 643-648.

Honoré, T., J. Drejer, M. Nielsen y C. Braestrup. (1986). Differentiation of Cl^-/Ca^{++} -dependent and sodium-dependent 3H -glutamate binding to cortical membranes from rat brain by high-energy radiation-inactivation analysis. J. Neural Trans. 65: 93-101.

Howell, G.A., M.G. Welch y C.J. Frederickson. (1984). Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. Nature 308: 736-738.

Hyndman, A.G. (1984). The effects of glutamate and kainate on

cell proliferation in retinal cultures. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 25: 558-563.

Hyndman, A.G. y R. Adler. (1982). Analysis of glutamate uptake and monosodium glutamate toxicity in neural retina monolayer cultures. Dev. Brain Res. 2: 303-314.

Jahr, C.E. y C.F. Stevens. (1987). Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. Nature 325: 522-525.

Johnson, J.W. y P. Ascher. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature 325: 529-533.

Juurlink, B.H.J. y S. Fedoroff. (1980). Differentiation capabilities of mouse optic stalk in isolation of its immediate in vivo environment. Dev. Biol. 78: 215-221.

Juurlink, B.H. y L. Hertz. (1985). Pasticity of astrocytes in primary cultures; an experimental tool and a reason for methodological caution. Dev. Neurosci. 7: 263-277.

Kimelberg, H.K., Bowman, C., Biddlecome, S. y R.S. Bourke (1979). Cation transport and membrane potential of primary astroglial cultures of neonatal rat brains. Brain Res. 177: 533-550.

Kleckner, N.W. y R. Dingledine. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Science 241: 835-837.

Krogsgaard-Larsen, P., E.O. Nielsen y D.R. Curtis. (1984). Ibotenic acid analogues. Synthesis and biological and in vitro activity of conformationally restricted agonists at central excitatory amino acid receptors. J. Med. Chem. 27: 585-591.

Langen, C.D.J., F. Hogentrom y A.H. Mulder. (1979). Presynaptic noradrenergic α -receptors and modulation of ^3H -noradrenaline release from rat brain synaptosomes. Eur. J. Pharmacol. 60: 79-89.

Langer, S.Z. (1981). Presynaptic regulation of the release of catecholamines. Pharmacol. Rev. 32: 337-362.

Large, T.H., N.J. Choi, F.G. DeMello y W.L. Klein. (1985). Molecular alteration of a muscarinic acetylcholine receptor system during synaptogenesis. J. Biol. Chem. 260: 8873-8881.

Lazarewicz, J.W., J.T. Wroblewski, M.E. Palmer y E. Costa. (1988). Activation of NMDA-sensitive glutamate receptors stimulates arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. Neuropharmacol. 27: 765-769.

Levi, G. y M. Raiteri. (1978). Modulation of γ -aminobutyric acid transport in nerve endings: role of extracellular γ -aminobutyric acid and of cationic fluxes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75(6): 2981-2985.

- Lincoln, J.S., R. Coopersmith, E.W. Harris, D.T. Monaghan, C.W. Cotman y M. Leon. (1986). NMDA receptor blockade prevents the neural and behavioral consequences of early olfactory experience. Soc. Neurosci. Abstr. 12: 124.
- Linser, D. y A.A. Moscona. (1981). Carbonic anhydrase C in the neural retina. Transition from generalized to glial-specific cell localization during embryonic development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7190-7194.
- López Colomé, A.M. (1981). High-affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. Neurochem. Res. 6: 1019-1033.
- López Colomé, A.M. y P.J. Roberts. (1987). Effect of excitatory amino acid analogues on the release of D-[³H]-aspartate from chick retina. Eur. J. Pharmacol. 142: 409-417.
- López Colomé, A.M. y F. Somohano. (1982). Characterization of [³H]-aspartate binding to chick retinal subcellular fractions. Vision Res. 22: 1495-1501.
- López Colomé, A.M. y F. Somohano. (1984). Localization of L-glutamate and L-aspartate synaptic receptors in chick retinal neurons. Brain Res 298:159-162.
- López Colomé, A.M. y F. Somohano. (1987). Characterization of quisqualate-type L-glutamate receptors in the retina. Brain Res. 414: 99-108.
- Lowry, O.H., W.J. Rosenbrough, A.L. Fatt y R.S. Randall. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Mattson, M.P., R.E. Lee, M.E. Adams, P.B. Guthrie y S.B. Kater. (1988). Interactions between entorhinal axons and target hippocampal neurons: a role for glutamate in the development of hippocampal circuitry. Neuron 1(9): 865-876.
- Mayer, M.L., L. Vyklicky Jr. y J. Clements. (1989). Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. Nature 338: 425-429.
- Mayer, M.L., G.L. Westbrook y P.B. Guthrie. (1984). Voltage-dependent block by Mg⁺⁺ of NMDA responses in spinal cord neurons. Nature 309: 261-263.
- Mayer, M.L. y G.L. Westbrook. (1985). The action of N-methyl-D-aspartic acid on mouse spinal neurons in culture. J. Physiol (Lond.) 361: 65-90.
- McBean, G.J. y P.J. Roberts. (1981). Glutamate-preferring receptors regulate the release of D-³H-aspartate from rat hippocampal slices. Nature 291: 593-

- Meller, K. (1984). Morphological studies on the development of the retina. En: Progress in retinal research Vol. 3. (N.N. Osborne y G.J. Chader, Eds.). Pergamon Press, Oxford.
- Mitchell, P.R. e I.L. Martin. (1978). Is GABA release modulated by presynaptic receptors? Nature 274: 904-905.
- Monaghan, D.T., V.R. Holets, D.W. Toy y C.W. Cotman. (1983). Anatomical distribution of four pharmacologically distinct ³H-L-glutamate binding sites. Nature 306: 176-179.
- Monaghan, D.T. y C.W. Cotman. (1985). Distribution of NMDA-sensitive L-³H-Glu binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography. J. Neurosci. 2909-2919.
- Monaghan, D.T., H.J. Olverman, L. Nguyen, J.C. Watkins y C.W. Cotman. (1988). Two classes of NMDA recognition sites: differential distribution and differential regulation by glycine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9836-9840.
- Morgan, I.G. (1983). Excitatory amino acid pathways in the vertebrate retina. J. Neurochem. 41: 592-
- Morgan, I.G. y C.A. Ingham. (1981). Kainic acid affects both plexiform layers of chick retina. Neurosci. Lett. 21: 275-280.
- Mori-Okamoto, J. y Y. Ikeda. (1986). Effect of calcium ions on the sensitivities of cultured cerebellar neurons to glutamate and aspartate. Dev. Brain Res 26: 1-10.
- Mori-Okamoto, J y J. Tatsuno. (1985). Development of sensitivity to GABA and glycine in cultured cerebellar neurons. Dev. Brain Res. 20: 249-258.
- Murakami, M., T. Ohtsuka y H. Shimosaki. (1975). Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina. Vision Res 15: 456-458.
- Nawy, S. y D.R. Copenhagen. (1987). Multiple classes of glutamate receptor in depolarizing bipolar cells in the retina. Nature 325: 56-58.
- Neal, M.J. (1976). Amino acid transmitter substances in the vertebrate retina. Gen. Pharmacol. 7: 321-322.
- Newman, E.A. (1986). The Müller Cell. En: Astrocytes Vol I. (S. Fedoroff y A. Vernadakis, Eds.). Academic Press, Inc. London.
- Nicoletti, F., J.T. Wroblewski y E. Costa. (1987). Magnesium ions inhibit the stimulation of inositol phospholipid hydrolysis by endogenous excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. J. Neurochem. 48: 967-973.
- Nicoletti, F., J.T. Wroblewski, E. Fadda y E. Costa. (1988). Pertussis toxin inhibits signal transduction at a specific

metabotropic glutamate receptor in primary cultures of cerebellar granule cells. Neuropharmacol. 27(6): 551-556.

Novelli, A., F. Nicoletti, J.T. Wroblewski, H. Alho, E. Costa y A. Guidotti. (1987). Excitatory amino acid receptors coupled with guanylate cyclase in primary cultures of cerebellar granule cells. J. Neurosci. 7(1): 40-47.

O'Dell, T.J. y B.N. Christensen. (1989). A voltage clamp study of isolated stingray horizontal cell non-NMDA excitatory amino acid receptors. J. Neurophys. 61(1): 162-171.

Pelayo, F., M.L. Dubocovich y S.Z. Langer. (1977). Regulation of noradrenaline release from the rat pineal through presynaptic adrenoceptors. Possible involvement of cyclic nucleotides. Nature 274: 76-78.

Peters, S., J. Koh y D.W. Choi. (1987). Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. Science 236: 589-593.

Pin, J.P., J. Bockaert y M. Recasens. (1984). The Ca⁺⁺/Cl⁻ dependent L-[³H]-glutamate binding: a new receptor or a particular transport process? FEBS Lett. 175(1):31-36.

Pin, J.P., B.J. Van-Vliet y J. Bockaert. (1988). NMDA- and kainate-evoked GABA release from striatal neurons differentiated in primary culture: differential blocking by phencyclidine. Neurosci. Lett. 87: 87-92.

Polak, R.L. (1971). The stimulating action of atropine on the release of acetylcholine by rat cerebral cortex in vitro. Br. J. Pharmacol. 41: 600-606.

Polyak, S.L. (1941). The Retina. Univ. of Chicago Press. Chicago, Illinois.

Rager, G. (1979). The cellular origin of the b-wave in the electroretinogram - a developmental approach. J. Comp. Neurol. 225: 244 - .

Rauschecker, J.P. y S. Hahn. (1987). Ketamine-xylazine anaesthesia blocks consolidation of ocular dominance changes in kitten visual cortex. Nature 326: 183-187.

Reichenbacher, D., W. Reimann y K. Starke. (1982). α -adrenoceptor mediated inhibition of noradrenaline release in rabbit brain cortex slices. Naunyn-Schmiedeberg's Archiv. Pharmacol. 319: 71-77.

Reynolds, J.J., S.N. Murphy y R.J. Miller. (1987). ³H-labeled MK-801 binding to the excitatory amino acid receptor complex from rat brain is enhanced by glycine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7744-7748.

- Richelson, E. (1980). Binding to intact cultured cells of nervous tissue origin. En: Receptor Binding Techniques. Short Course Syllabus p. 218-240.
- Rosenberg, R.N. (1973). Regulation of neuronal enzymes in cell culture. En: Tissue culture in the Nervous System. (G. Sato, Ed.). Plenum Press, N.Y. p. 107-134.
- Sagar, S.M. y F.R. Sharp. (1990). Light induces a Fos-like nuclear antigen in retinal neurons. Mol. Brain Res. 7: 17-21.
- Scheller, P.H., J.H. Sandell y J.H.R. Maunsell. (1986). Functions of the ON and OFF channels of the visual system. Nature 322: 824-825.
- Schmidt, W. y G. Wolf. (1988). High-affinity uptake of L-[³H] glutamate and D-[³H]aspartate during postnatal development of the hippocampal formation: a quantitative autoradiographic study. Exp. Brain Res. 70: 50-54.
- Schuetze, S.M., E.F. Frank y G.D. Fischbach. (1978). Channel open time and metabolic stability of synaptic and extrasynaptic acetylcholine receptors on cultured chick myotubes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81: 753-756.
- Shiells, R.A., G. Falk y S. B.Naghshineh. (1981). Action of glutamate and aspartate analogues on rod horizontal and bipolar cells. Nature 294: 592-594.
- Silverstein, F.S., R. Chen y M.V. Johnston. (1986). The glutamate analogue quisqualic acid is neurotoxic in striatum and hippocampus of immature rat brain. Neurosci. Lett. 71: 13-18.
- Slaughter, M.M. y R.F. Miller. (1981). 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. Science 211: 182-184.
- Snell, L.D., R.S. Morter y K.M. Johnson. (1987). Glycine potentiates N-methyl-D-aspartate-induced [³H]-TCP binding to rat cortical membranes. Neurosci. Lett. 83: 313-317.
- Somohano, F. y A.M. López Colomé. (1989). Aminoácidos excitadores y plasticidad neuronal. Ciencia. En prensa.
- Somohano, F., P.J. Roberts y A.M. López Colomé. (1988). Maturation changes in retinal excitatory amino acid receptors. Dev. Brain Res. 42:59-67.
- Starke, K. (1977). Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 77: 1-124.
- Stewart, M.G. y R.C. Bourne. (1987). Ontogeny of ³H-muscimol binding to membranes of chick forebrain. Exp. Brain Res. 65: 707-710.

Szerb, J.C. (1964). The effect of tertiary and quaternary atropine on cortical acetylcholine output and the electroencephalogram in cats. Can. J. Physiol. Pharmacol. 42: 303-314.

Thomas, T.N. y D.A. Redburn. (1978). Uptake of ^{14}C -aspartic acid and ^{14}C -glutamic acid by retinal synaptosomal fractions. J. Neurochem. 31: 63-68.

Thompson, J.M. (1982). Increase in acetylcholine release from chick embryo retina during development. Dev. Brain Res. 4: 259-264.

Uga, S. y G.K. Smelser. (1973). Electron microscopic study of the development of retinal Müllerian cells. Invest. Ophthalmol. 12: 295-307.

Vizi, E.S. (1974). Interaction between adrenergic and cholinergic systems: presynaptic inhibitory effect of noradrenaline on acetylcholine release. J. Neural Transmission Suppl. 11: 61-78.

Vizi, E.S. (1979). Presynaptic modulation of neurochemical transmission. Prog. in Neurobiol. 12: 181-290.

Vlachova, V., L. Vyklicky, L. Jr. Vyklicky y T. Vyskocil. (1987). The action of excitatory amino acids on chick spinal cord neurons in culture. J. Physiol. 386: 425-438.

Wahl, P., A. Schousboe, T. Honoré y J. Drejer. (1989). Glutamate-induced increase in intracellular Ca^{++} in cerebral cortex neurons is transient in immature cells but permanent in mature cells. J. Neurochem. 53: 1316-1319.

Westbrook, G.L. y M.L. Mayer (1987). Micromolar concentrations of Zn^{++} antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. Nature 328: 640-643.

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

Wickberg, J.E.S. (1979). The pharmacological classification of adrenergic α_1 and α_2 receptors and their mechanisms of action. Acta Physiol. Scand. Suppl. 468: 1-99.

Woodward, D.J., B.J. Hoffer, G.R. Siggins y F.E. Bloom. (1971). The ontogenetic development of synaptic junctions, synaptic activation and responsiveness to neurotransmitter substances in rat cerebellar Purkinje cells. Brain Res. 34: 73-97.

Wunk, D.F y F.S. Werblin. (1979). Synaptic inputs to the ganglion cells in the tiger salamander retina. J. Gen. Physiol. 73: 265-286.

Zeevalk, G.D. y A.G. Hyndman. (1986). Lucifer yellow labeling of embryonic chick retinal amacrine cells in vitro. Neurosci. Lett. 64: 275-280.