

R622a
c.1

EL ACIDO GLUTAMICO COMO NEUROTRANSMISOR EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL:
PRESENCIA EN VESICULAS SINAPTICAS Y PROBABLE MECANISMO DE TOXICIDAD.

TESIS

entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

NORA MARIA RIVEROS KELLER

Septiembre 1988

Director de tesis: Dr. Fernando Orrego V.



Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias
que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

NORA MARIA RIVEROS KELLER

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de
Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en
el examen de Defensa de Tesis rendido el día 17 de Junio de 1988.

Patrocinante de Tesis

..... *F. Orrego*

Comisión informante de Tesis

..... *M. Rivera*

..... *G. Salanti*

..... *[Signature]*

..... *Beltrán*



Esta Tesis fué realizada en el laboratorio de Neuroquímica del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y contó con el patrocinio del Departamento de Bioquímica de la misma Facultad.



A mi abuela Chelo.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Orrego por darme la oportunidad de desarrollar esta Tesis en su laboratorio, brindándome apoyo científico y personal durante los años que trabajé bajo su dirección

Al Dr. E. Motles por su ayuda desinteresada en los experimentos de registro electroencefalográfico

A Patricio Cancino por su valiosa cooperación, sin la cual no habría sido posible llevar a cabo este trabajo

A José Mondaca por la excelente voluntad y la dedicación con que confeccionó cada figura

A Juan Arroyo por su paciencia y buena disposición para ayudarme en la transcripción y corrección del manuscrito

A Adelita y Aldo, mis compañeros y amigos en los inicios de esta Tesis

A Xavier y Omar por el encuentro cotidiano, el hombro amigo, los microbios, el desorden y todo lo compartido por años, dentro y fuera de nuestra oficina

A Fernando Torrealba y Ana María por la generosa amistad de siempre

A mis amigos y compañeros de trabajo por los buenos momentos que pasamos juntos

A mis papás y hermanos

A mi Andresito

GRACIAS



INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
ESTRUCTURA QUIMICA DE COMPUESTOS CITADOS EN EL TEXTO	
1. aminoácidos excitadores.....	xv
2. antagonistas de los receptores de glutamato	xvi
3. agonista del ácido quisquálico.....	xvii
4. compuestos excitadores que se unen a receptores para glutamato	xvii
5. Sustancia inhibidoras del SNC	xviii
6. Compuestos citados en la tesis.....	xviii
RESUMEN.....	xix
ABSTRACT	xxiii
PUBLICACIONES ORIGINADAS A PARTIR DE RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTA TESIS.....	
	xxvii
INTRODUCCION.....	1
NATURALEZA DE LOS NEUROTRANSMISORES EXCITADORES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	
	3
A. GLUTAMATO Y ASPARTATO COMO NEUROTRANSMISORES.....	4
1. Distribución regional de glutamato y aspartato en el SNC.....	4
2. Sistema de inactivación sináptica de glutamato y aspartato	5
3. Liberación inducida de glutamato y aspartato	5
4. Identidad de acción : acción postsináptica de glutamato y aspartato	7
5. Interacción de glutamato y aspartato con un receptor de membrana	8

Caracterización farmacológica del receptor.	
i) Receptor que une N-metil-D-aspartato.....	10
ii) Receptor que une quisqualato.....	11
iii) Receptor que une kainato.....	11
6. Presencia de glutamato y aspartato en vesículas. sinápticas	12
B. N-ACETILASPARTILGLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISOR.....	15
C. METILTETRAHIDROFOLATO Y SU FUNCION EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	16
ACCION NEUROTOXICA DE AMINOACIDOS EXCITADORES	18
EFECTO DE LOS AMINOACIDOS ACIDOS SOBRE LA PERMEABILIDAD CELU- LAR Y SU POSIBLE RELACION CON EL MECANISMO DE NEUROTOXICIDAD	21
EFECTO DE SUSTANCIAS DEPRESORAS DEL SNC SOBRE EL FLUJO DE CALCIO.....	23
EFECTO DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS DEL SNC SOBRE EL FLUJO DE CALCIO.....	24
OBJETIVOS DE LA TESIS.....	26
MATERIAL Y METODOS.	
1. ANIMALES Y REACTIVOS	27
2. PREPARACION DE MEMBRANAS SINAPTICAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.....	28
3. ESTUDIO DE LA UNION DE ³ H - KAINATO A MEMBRANAS SINAPTICAS	
i) Ensayo	28
ii) Estabilización de los receptores para kainato	30
4. ESTUDIO DE LA UNION ESPECIFICA DE ³ H -N-METIL-D,L-ASPAR TATO A SU RECEPTOR DE MEMBRANA.....	32
5. CONTROL DE PUREZA DE LAS SUSTANCIAS RADIATIVAS.....	32
6. PREPARACION DE VESICULAS SINAPTICAS.	
i) Método de Hata	33

	Pág.
ii) Método de Seidler.....	35
7. PURIFICACION DE VESICULAS SINAPTICAS POR FILTRACION EN COLUMNA DE SEFAROSA-4B.....	35
8. EXTRACION DEL CONTENIDO VESICULAR.....	36
9. DETECCION DE COMPUESTOS ENDOGENOS QUE SE UNEN AL RECEPTOR DE KAINATO.....	37
10. FILTRACION DEL EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS EN GEL DE SEPHADEX G -10	38
11. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE UN EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS	38
12. ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE DE UN EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS	39
13. CAPTACION DE GLUTAMATO POR VESICULAS SINAPTICAS	39
14. ENTRADA DE CALCIO A REBANADAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.	40
Calculo.....	42
15. HIDROLISIS ENZIMATICA Y ANALISIS DEL CONTENIDO DE AMINO ACIDOS EN N - ACETIL-ASPARTILGLUTAMATO	42
16. EFECTO DE N-ACETIL-ASPARTILGLUTAMATO Y GLUTAMATO EN CEREBRO DE GATO, in vivo.....	43
17. DETERMINACION DE PROTEINAS	44
 RESULTADOS	
BUSQUEDA DE UNA SUSTANCIA ENDOGENA CONTENIDA EN VESICULAS SINAPTICAS QUE SE UNA A RECEPTORES DE KAINATO Y N-METIL-D-ASPARTATO .	45
A. EFECTO DE GLUTAMATO, KAINATO Y ASPARTATO SOBRE LA UNION DE ³ H-KAINATO A SU RECEPTOR DE MEMBRANA.....	46
B. ESTUDIO DE LA UNION DE ³ H -N-METIL -D,L-ASPARTATO A SU RECEPTOR DE MEMBRANA.....	48
C. INHIBICION DE LA UNION DE ³ H-KA POR UNA SUSTANCIA CONTENIDA EN VESICULAS SINAPTICAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.....	49

	Pág.
D. SEPARACION Y CARACTERIZACION DEL COMPONENTE ENDOGENO QUE SE UNE AL RECEPTOR DE ACIDO KAINICO.....	49
Filtración por columna de Sefadex G-10	49
Cromatografía en capa fina	51
Electroforesis de alto voltaje :	
i) en ácido fórmico al 8%, pH 1,9	51
ii) en amortiguador acetato 2 M, pH 2,9	54
E. PURIFICACION PARCIAL DE VESICULAS SINAPTICAS Y DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE GLUTAMATO EN ELLAS .	59
Filtración de vesículas sinápticas a través de una columna de Sefarosa 4B .	
i) vesículas preparadas por el método de Hata.....	61
ii) vesículas preparadas por el método de Seidler.....	63
F. CAPTACION DE GLUTAMATO POR VESICULAS SINAPTICAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA	66
ENTRADA DE CALCIO A CORTES DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA, <u>in vitro.</u>	
A. EFECTO DE KAINATO SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO	68
B. EFECTO DE GLUTAMATO Y HOMOCISTEATO	69
C. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AMINOACIDOS EXCITADORES SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO	72
D. CARACTERIZACION DE LA ENTRADA DE CALCIO ASOCIADA A LA ACTIVACION DE RECEPTORES PARA AMINOACIDOS EXCITADORES	74
i) efecto de iones cadmio y cobalto.....	75
ii) efecto de nifedipina	76
iii) efecto de tetrodotoxina.....	78
E. EFECTO DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS Y DEPRESORAS DEL SNC SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO ESTIMULADA POR AMINO ACIDOS EXCITADORES .	
i) efecto de ácido δ - amino butírico.....	80

	Pág.
ii) efecto de adenosina	82
iii) efecto de etanol, pentobarbital y morfina	82
 ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO EXCITADOR DEL N-ACETILASPARTIL GLUTAMATO EN DIFERENTES PREPARACIONES DE CEREBRO, <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u> .	
A. EFECTO DE NAAG SOBRE LA UNION DE ³ H-KA A MEMBRANAS	88
B. EFECTO DE NAAG SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO A REBANADAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA	92
C. EFECTO DE NAAG Y ACIDO GLUTAMICO EN CEREBRO DE GATO, <u>in</u> <u>vivo</u>	92
 DISCUSION	
BUSQUEDA DE LA SUSTANCIA ENDOGENA EXCITADORA QUE SE UNE A LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO EN EL SNC.....	99
A. UNION DE ³ H-KAINATO A MEMBRANAS.....	100
B. UNION DE ³ H-NMA A MEMBRANAS	101
C. ACIDO N-ACETILASPARTILGLUTAMICO COMO POSIBLE LIGANDO ENDOGENO DEL RECEPTOR QUE UNE KAINATO Y GLUTAMATO	102
D. PRESENCIA DE UNA SUSTANCIA CONTENIDA EN VESICULAS SINAP- TICAS QUE SE UNE AL MISMO RECEPTOR QUE EL KAINATO	106
E. CARACTERIZACION DE LA SUSTANCIA ACTIVA PRESENTE EN VESI- CULAS SINAPTICAS	108
F. PURIFICACION PARCIAL DE LAS VESICULAS SINAPTICAS.....	109
G. CUANTIFICACION DEL GLUTAMATO CONTENIDO EN VESICULAS SINAPTICAS.....	111
H. CAPTACION DE GLUTAMATO POR VESICULAS SINAPTICAS	114
 MECANISMOS IONICOS INVOLUCRADOS EN LA NEUROTOXICIDAD DE LOS AMINOACIDOS EXCITADORES.	
A. EFECTO DE AMINOACIDOS ACIDOS SOBRE EL FLUJO DE CALCIO.....	116
B. CARACTERIZACION DEL CANAL INVOLUCRADO.....	121

	Pág.
C. EFECTO DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS DEL SNC SOBRE LOS FLUJOS DE CALCIO.....	123
D. EFECTO DE SUSTANCIAS DEPRESORAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL SOBRE LOS FLUJOS DE CALCIO.....	125
APENDICE	
Contenido de glutamato en vesículas sinápticas	130
BIBLIOGRAFIA	131

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA I. Efecto de diferentes procedimientos sobre la unión de $^3\text{H-KA}$ a membranas de corteza cerebral de rata...	31
TABLA II. Fraccionamiento de extractos de vesículas sinápticas por electroforénesis de alto voltaje.....	60
TABLA III. Efecto de la concentración de aminoácidos y análogos sobre la captación de ^{45}Ca	73
TABLA IV. Efecto de N-acetilaspargilglutamato sobre la unión específica de $^3\text{H-kainato}$ a membranas de corteza cerebral de rata.....	89

LISTA DE FIGURAS

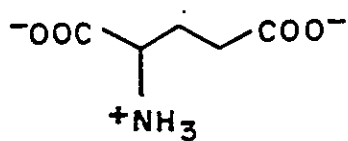
		Pág.
FIGURA 1.	Preparación de vesículas sinápticas por el método de Hata. Extracción del contenido vesicular	34
FIGURA 2.	Sistema de detección de compuestos endógenos que se unen al receptor de kainato.....	37
FIGURA 3.	Entrada de calcio a rebanadas de corteza cerebral de rata.....	41
FIGURA 4.	A. Unión de ^3H -kainico a membranas sinápticas, competencia con kainato y glutamato frío. B. Gráfico de Hill.....	47
FIGURA 5.	Acido ^3H -kainico unido a membranas en presencia de un extracto de vesículas sinápticas.....	50
FIGURA 6.	Fraccionamiento de sustancias endógenas que se unen al receptor de kainato, contenidas en un extracto de vesículas sinápticas de corteza cerebral de rata.....	52
FIGURA 7.	A y B. Electroforesis de alto voltaje de un extracto de vesículas sinápticas de corteza cerebral de rata.....	55
FIGURA 8.	Electroforesis de alto voltaje de un extracto de vesículas sinápticas de cuerpo estriado, hipotálamo y cerebelo.....	58
FIGURA 9.	Filtración de vesículas sinápticas por Sefarosa 4B. Método de Hata.....	62
FIGURA 10.	Filtración de vesículas sinápticas por Sefarosa 4B. Método de Seidler.....	64
FIGURA 11.	Captación de glutamato por vesículas sinápticas	67
FIGURA 12.	Efecto de kainato sobre la entrada de calcio a cortes de corteza cerebral	70
FIGURA 13.	Efecto de glutamato y homocisteato sobre la entrada de calcio	71
FIGURA 14.	Efecto de los iones cobalto y cadmio sobre la entrada de calcio estimulada por NMA	76

FIGURA 15.	Efecto de NMA y nifedipina sobre el curso temporal de la captación de calcio.....	77
FIGURA 16.	Efecto de tetrodotoxina sobre la entrada de calcio estimulada por NMA.	79
FIGURA 17.	Acción de GABA sobre la entrada de calcio.....	81
FIGURA 18.	Adenosina y entrada de calcio	83
FIGURA 19.	A. Efecto de etanol sobre la entrada de calcio activada por NMA.....	84
	B. Efecto de etanol sobre la entrada de calcio activada por glutamato.....	85
FIGURA 20.	Efecto de distintas concentraciones de etanol sobre la entrada de calcio estimulada por NMA o KA.....	86
FIGURA 21.	Pentobarbital y entrada de calcio.....	87
FIGURA 22.	Medición de ácidos aspártico y glutámico libres en membranas sinápticas de corteza cerebral, incubadas con y sin NAAG	91
FIGURA 23.	Influencia del NAAG sobre la entrada de calcio a cortes de corteza cerebral de rata.....	93
FIGURA 24.	A. Registro encefalográfico del efecto producido por la inyección de glutamato en hipocampo de gato, <u>in vivo</u>	96
	B. Registro encefalográfico del efecto producido por la inyección de glutamato y NAAG en hipocampo de gato, <u>in vivo</u>	97
FIGURA 25.	Contenido de glutamato en vesículas sinápticas purificadas	128

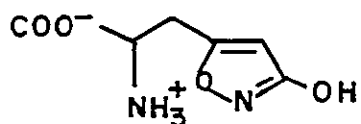
ABREVIATURAS.

- ASP = ácido aspártico
EEG = electroencefalograma
EGTA = etilenglicol-bis(β -aminoetil), N, N'-tetracetato
EVS = extracto soluble de vesículas sinápticas
GABA = ácido δ -amino butírico
GLU = ácido glutámico
HEPES= N-2-hidroxiethylpiperazín, N'-2 etanosulfonato de sodio
HVE = electroforesis de alto voltaje
KA = ácido kaínico
LCR = líquido cefaloraquídeo
NAAG = ácido N-acetilaspártico
NA = noradrenalina
NMDA = ácido N-metil-D-aspártico
NMA = ácido N-metil-D,L-aspártico
NF = nifedipina
QA = ácido quisquálico
PPO = 2,5-difeniloxazol
SNC = sistema nervioso central
SEFAROSA = sepharose
TCA = ácido tricloroacético
TRIS = Tris-(hidroximetil)-aminometano
TTX = tetrodotoxina
VS = vesículas sinápticas

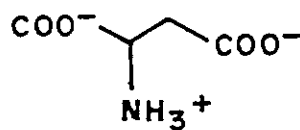
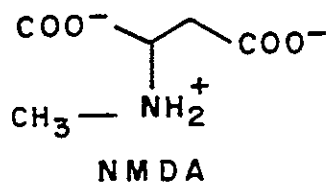
ESTRUCTURA DE AMINOACIDOS EXCITADORES



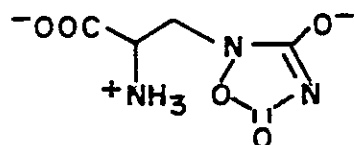
L- Glutamato



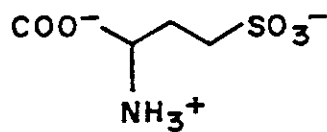
Ibotenato



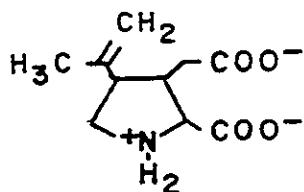
Aspartato



Quiscualato



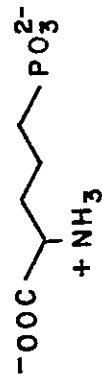
Homocisteato



Kainato

ANTAGONISTAS DE RECEPTORES PARA GLUTAMATO.

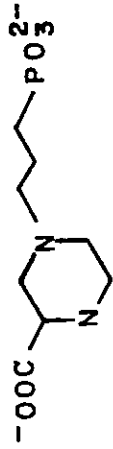
I Tipo NMDA:



D-2- Amino-5- fos-
fonopentanoato
(D-AP₅)

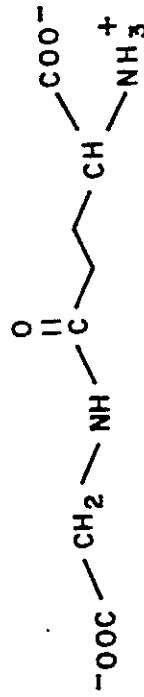


D-2- Amino-7- fosfo-
pentanoato (D-AP₇)

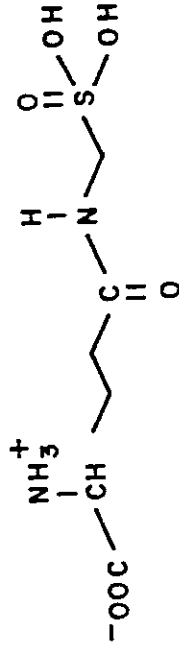


3-(2-Carboxipiperazín 4-il)-
propil-1- fosfonato (CPP)

II Tipo QUISCUALATO O KAINATO

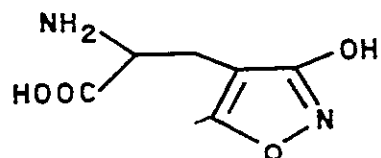


γ-D-Glutamilglicina (γ-D-GG)



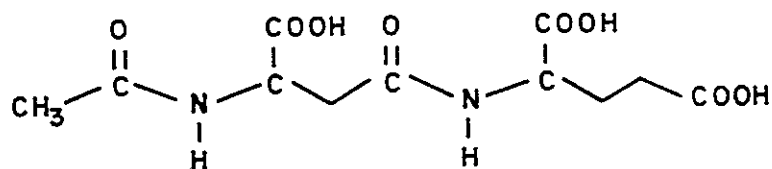
γ-D- Glutamil aminosulfonato (GAMS)

- AGONISTA DE ACIDO QUISCUALICO:

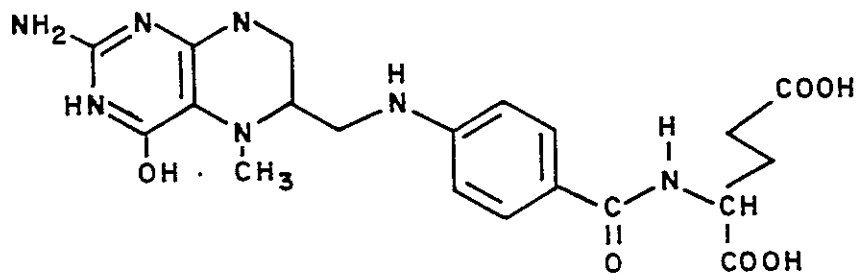


Acido α - amino-3 - hidroxil-5 metil-4 isoxasol propiónico (AMPA)

- COMPUESTOS EXCITADORES QUE SE UNEN AL RECEPTOR DE GLUTAMATO.



Acido N-acetil-aspartil-glutámico (NAAG)

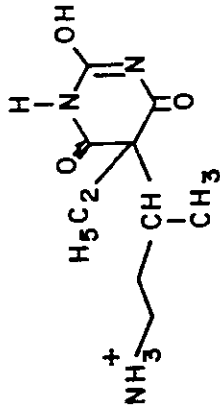


METIL TETRAHIDROFOLATO (MTHF)

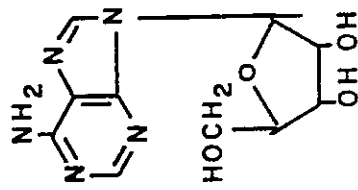
SUSTANCIAS INHIBIDAS DEL SNC:



Acido γ - amino butírico
(GABA)

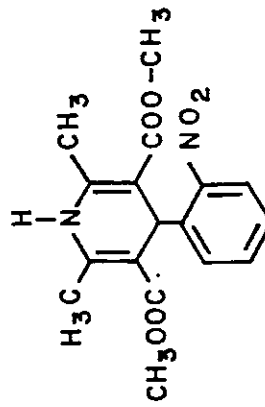


Pentobarbital

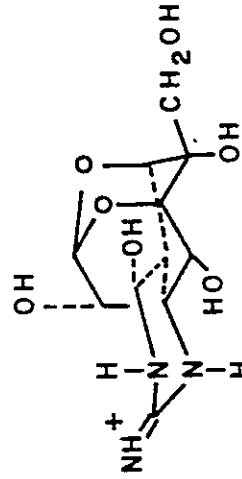


Adenosina

OTROS COMPUESTOS CITADOS EN LA TESIS.



Nifedipina (NF)



Tetrodotoxina (TTX)

RESUMEN

La caracterización y el estudio del mecanismo de acción de sustancias endógenas que en el sistema nervioso central se unen a los mismos receptores que el glutamato y el aspartato reviste gran interés, considerando el posible papel de éstos como neurotransmisores excitadores y por la posible relación que pudiera existir entre la alteración de su metabolismo y la etiología de ciertas enfermedades neurodegenerativas.

Se ha demostrado que el ácido kaínico, un análogo estructural del ácido glutámico, se une a receptores en la membrana plasmática neuronal. Este compuesto tiene efecto excitador sobre el sistema nervioso central y no es metabolizado ni transportado hacia el terminal presináptico como lo es el glutamato.

En este trabajo se usó la unión de kainato a membranas de corteza cerebral de rata como sistema de detección de sustancias con actividad biológica, contenidas en vesículas sinápticas. Estas sustancias, por tener una semejanza estructural con el kainato, competirían con él por unirse al receptor.

IDENTIFICACION DE LA SUSTANCIA ENDOGENA QUE SE UNE AL RECEPTOR DE KAINATO. El extracto soluble del contenido de vesículas sinápticas de corteza cerebral disminuyó la unión de ^3H -kainato a su receptor.

Al fraccionar éste extracto, por filtración a través de un

gel de Sephadex G-10, por cromatografía en capa fina o por electroforesis de alto voltaje, se determinó la presencia de sólo un componente endógeno capaz de competir con el kainato unido a las membranas. Este componente en todos los casos coincidió con el ácido glutámico. Al usar extractos de vesículas sinápticas de cerebelo, cuerpo estriado e hipotálamo, se obtuvo el mismo resultado.

PRESENCIA DE GLUTAMATO EN VESICULAS SINAPTICAS. Cuando las vesículas sinápticas de corteza preparadas de acuerdo al método de Hata y col. (1976) se pasaron a través de una columna de Sepharose 4B, la mayor parte del glutamato endógeno apareció en la fracción particulada junto con la ^3H -noradrenalina incorporada como marcador de vesículas sinápticas. Una cantidad muchísimo menor de glutamato eluyó en las fracciones correspondientes a los aminoácidos libres.

Estas vesículas sinápticas filtradas por Sefarosa 4B, fueron capaces de incorporar glutamato en forma dependiente de ATP y temperatura.

Se demostró que esta preparación estaba contaminada con vesículas de membrana plasmática resellada, formadas durante la homogeneización del tejido. Se determinó que no más del 2,9% del glutamato presente en la preparación de vesículas sinápticas filtradas correspondía a aminoácido atrapado en vesículas de membrana resellada. La contribución de esta contaminación citoplasmática no es significativa si se considera que la concentración de glutamato en vesículas sinápticas, según se ha demostrado posteriormente (Riveros y col., 1987), es por lo menos diez veces mayor que la concentración total del aminoácido en corteza.

Este es el primer trabajo que demuestra la presencia de cantidades sustanciales de glutamato en vesículas sinápticas.

ACIDO N-ACETILASPARTILGLUTAMICO COMO NEUROTRANSMISOR. Se ha postulado que el ácido N-acetilaspartilglutámico podría ser el compuesto endógeno que interactúa fisiológicamente con los receptores de glutamato, dada su alta concentración en el cerebro, su capacidad para desplazar al glutamato unido a membranas de cerebro de rata y su acción convulsivante en el sistema nervioso central.

En esta tesis se determinó que el N-acetilaspartilglutamato no afecta la entrada de Ca^{+2} a cortes de corteza cerebral in vitro, proceso que es estimulado por sustancias excitadoras. El dipéptido no es capaz de desplazar la unión de kainato a su receptor de membrana, a menos que se usen concentraciones muy altas del compuesto. Este hecho se explica por la hidrólisis enzimática del N-acetilaspartilglutamato que origina glutamato, el cual se une al receptor de kainato.

La infusión de N-acetilaspartilglutamato in vivo, mediante cánulas implantadas en forma permanente en el hipocampo o en el núcleo pulvinar del tálamo de gato, no tiene efecto excitador y no potencia ni antagoniza los efectos del glutamato. La acción excitadora y convulsivante del N-acetilaspartilglutamato descrita por otros autores obedecería a la generación de glutamato in situ.

AMINOACIDOS EXCITADORES, CALCIO Y DAÑO NEURONAL. Una gran cantidad de derivados y análogos del glutamato y del aspartato han sido catalogados como compuestos excitotóxicos, ya que al ser aplicados a neuronas

centrales de vertebrados producen excitación de ellas y en ciertas condiciones un efecto tóxico que se traduce en destrucción neuronal. El mecanismo que lleva a este daño celular no está claro.

En este trabajo se determinó que las sustancias excitadoras y neurotóxicas como el kainato, glutamato, homocisteato, N-metil-D,L-aspartato e ibotenato, aumentan significativamente la captación de calcio en cortes de corteza cerebral de rata, in vitro. Los análogos como el N-acetilaspártato y el α -metilaspártato, que no tienen propiedades excitadoras ni neurotóxicas, no favorecen la entrada de calcio. Se postula que el aumento masivo de la entrada de Ca^{2+} podría constituir el evento unificador de la acción neurotóxica de los aminoácidos excitadores, mediante la activación de proteasas intracelulares dependientes de calcio, las que llevarían a la destrucción neuronal.

La entrada de calcio estimulada por N-metil-D,L-aspartato fue bloqueada por Cd^{2+} y Co^{2+} , pero no por nifedipina ni tetrodotoxina. Estos datos sugieren que los aminoácidos excitadores, en su acción despolarizante en la corteza cerebral, producen la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje.

El ácido γ -aminobutírico, neurotransmisor inhibitorio, aumentó el flujo unidireccional de entrada de calcio y disminuyó la entrada de calcio estimulada por N-metil-D,L-aspartato. La adenosina, de efecto inhibitorio en el sistema nervioso central, no modificó la acción del N-metil-D,L-aspartato. El etanol, la morfina y el pentobarbital, sustancias depresoras del sistema nervioso central, no

tuvieron efecto sobre los flujos de calcio estimulados por N-metil-D,L-aspartato.

El efecto de estos compuestos depresores e inhibidores del sistema nervioso central ocurriría por un mecanismo diferente al que opera en la excitación producida por los aminoácidos ácidos.

ABSTRACT

The characterization and study of the mechanism of action of endogenous substances which in the central nervous system (CNS) bind to the same receptors as glutamate and aspartate do, is of great interest considering both their possible role as excitatory neurotransmitters and the relationship that might exist between the metabolic alteration of them and the genesis of some neurodegenerative diseases.

It is known that kainic acid, a rigid analogue of glutamic acid, binds to synaptic plasma membranes. This compound induces strong excitation of most vertebrate CNS neurons, is not metabolized and does not interact with the glutamate uptake system.

In the present work we used rat brain cortex kainic acid receptors as detectors for synaptic vesicle-bound endogenous ligands. Due to the structural similarities of these ligands with the kainate molecule, they might compete and displace it from the receptor.

IDENTIFICATION OF ENDOGENOUS SUBSTANCES THAT BIND TO KAINATE RECEPTORS. A soluble extract obtained from synaptic vesicles contained a substance that competed with $^3\text{H-KA}$ for its binding to the receptor. When this extract was fractionated by gel filtration on Sephadex G-10, by thin layer chromatography or by high voltage electrophoresis,

that binds to glutamate receptors. It is present in high concentrations in the mammalian brain, is able to displace ^3H -glutamate from one of its binding sites in rat brain membranes and induce convulsions when injected into the hippocampus. In this work it was shown that N-acetylaspartylglutamic acid has no effect on $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx into rat brain cortex slices, in vitro, a process that is enhanced by excitatory substances. At very high concentrations N-acetylaspartylglutamic acid was able to inhibit the binding of kainic acid to its receptors. It was shown however, that L-glutamate was released by hydrolysis of N-acetylaspartylglutamic acid during the incubation period and the inhibition observed could be accounted by this release of L-glutamate.

N-acetylaspartylglutamic acid was ineffective when infused, in vivo, through a cannula permanently implanted into the hippocampus or into the pulvinar nucleus of the thalamus of an adult cat. It was also unable to potentiate or to antagonize the effects of glutamate in the same system. The excitatory and convulsant action observed by other authors could be accounted by the hydrolysis of N-acetylaspartylglutamic acid that generated glutamate in situ.

EXCITATORY AMINOACIDS, CALCIUM AND NEURONAL DAMAGE. A large amount of derivatives and analogues of glutamate and aspartate have been called excitotoxic compounds, because they are powerful excitants of vertebrate central neurons, and if applied under certain conditions are also capable of destroying such cells. The mechanism responsible for the irreversible damage to neurons remains unclear.

It was shown that the excitatory and neurotoxic compounds kainate, glutamate, homocysteate, N-methyl-D,L-aspartate and ibotenate

a single endogenous component that in all cases comigrated with glutamic acid, was found. Synaptic vesicles extracts derived from corpus striatum, hypothalamus and cerebellum also gave the same results.

GLUTAMATE INSIDE SYNAPTIC VESICLES. When synaptic vesicles prepared by the procedure of Hata et al. (1976), were passed through a Sepharose 4B gel filtration column, most of the endogenous glutamate appeared in the particulate fraction, where almost all of the protein and ^3H -noradrenaline used as a synaptic vesicle marker, were present. Much less endogenous glutamate was found in the fractions that corresponded to free aminoacids.

Synaptic vesicles, purified on Sepharose 4B columns were able to accumulate glutamate by an ATP and temperature dependent mechanism.

It was found that the synaptic vesicle preparation was contaminated by resealed vesicles of plasma membranes formed during the isolation procedure. It was shown, however that less than 2,9% of the endogenous glutamate present in particles isolated by filtration on Sepharose 4B, derived from trapped cytosolic glutamate. In any case the contribution of this contamination is not significant when compared with the at least ten fold higher concentration found inside the vesicles, relative to that in the whole cortex (Riveros et al., 1986).

This work is the first one to show that a substantial amount of glutamate is present inside the synaptic vesicles.

N-ACETYLSPARTYLGLUTAMIC ACID AS A NEUROTRANSMITTER. It has been suggested that N-acetylaspartylglutamic acid might be the natural ligand

that binds to glutamate receptors. It is present in high concentrations in the mammalian brain, is able to displace ^3H -glutamate from one of its binding sites in rat brain membranes and induce convulsions when injected into the hippocampus. In this work it was shown that N-acetylaspartylglutamic acid has not effect on $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx into rat brain cortex slices, in vitro, a process that is enhanced by excitatory substances. At very high concentrations N-acetylaspartylglutamic acid was able to inhibit the binding of kainic acid to its receptors. It was shown however, that L-glutamate was released by hydrolysis of N-acetylaspartylglutamic acid during the incubation period and the inhibition observed could be accounted by this release of L-glutamate.

N-acetylaspartylglutamic acid was ineffective when infused, in vivo, through a cannula permanently implanted into the hippocampus or into the pulvinar nucleus of the thalamus of an adult cat. It was also unable to potentiate or to antagonize the effects of glutamate in the same system. The excitatory and convulsant action observed by other authors could be accounted by the hydrolysis of N-acetylaspartylglutamic acid that generated glutamate in situ.

EXCITATORY AMINOACIDS, CALCIUM AND NEURONAL DAMAGE. A large amount of derivatives and analogues of glutamate and aspartate have been called excitotoxic compounds, because they are powerful excitants of vertebrate central neurons, and if applied under certain conditions are also capable of destroying such cells. The mechanism responsible for the irreversible damage to neurons remains unclear.

It was shown that the excitatory and neurotoxic compounds kainate, glutamate, homocysteate, N-methyl-D,L-aspartate and ibotenate

increased significantly the ^{45}Ca uptake in rat thin brain cortex slices incubated in vitro, while non excitatory non neurotoxic acidic aminoacids such as N-acetylaspartate and α -methyiaspartate did not increased such influx.

It is possible that enhanced calcium uptake may represent the basis for the neurotoxic effects of these compounds as a result of the activation of calcium dependent intracellular proteases.

The calcium uptake stimulated by N-methyl-D,L-aspartate was blocked by cadmium and cobalt ions but not by nifedipine or by tetrodotoxin. These findings suggest that excitatory amino acids, because of their neuronal depolarizing action in brain cortex, lead to the opening of voltage sensitive calcium channels.

γ -amino butyrate, an inhibitory CNS transmitter, slightly increased calcium influx, but decreased that induced by N-methyiaspartate. Adenosine had no effect on the influx.

Ethanol, pentobarbital and morphine, CNS depressors were unable to inhibit N-methyiaspartate-activated calcium influx.

The results suggest that the depressant and inhibitory effects of these substances, on calcium fluxes, occur through interference with a different neuronal mechanism than the one which operates in the excitatory aminoacids action.

PUBLICACIONES ORIGINADAS A PARTIR DE RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTA

TESIS

Riveros, N. y Orrego, F. (1982). A search in rat brain cortex synaptic vesicles for endogenous ligands for kainic acid receptors. *Brain Research*, 236., 492-496.

Berdichewsky, E., Riveros, N., Sánchez Armáñs S., Orrego, F. (1983). Kainate, N-methylaspartate and other excitatory aminoacids increase calcium influx into rat brain cortex cells, in vitro. *Neurosci. Lett.* 36, 75-80.

Riveros, N. y Orrego, F. (1984). A study of possible excitatory effects of N-acetylaspartylglutamate in different in vivo and in vitro brain preparations. *Brain Research* 299, 393-396.

Riveros, N. y Orrego, F. (1985). N-methylaspartate activated calcium channels in rat brain cortex slices. Effect of calcium channels blockers and of inhibitory and depresant substances. *Neuroscience* 17, 541-546.

Riveros, N., Fiedler, J., Lagos, N., Muñoz, C. y Orrego, F., (1986). Glutamate in rat brain cortex synaptic vesicles: influence of the vesicle isolation procedure. *Brain Res.* 386, 405-408.

Berdichevsky, E., Muñoz, C., Riveros, N., Cartier, L. y Orrego, F. (1987) Neuropathological changes in the rat brain cortex, in vitro: Effects of kainic acid and of ion substitutions. *Brain Res.* 423, 213-220.

Capítulos de Libros

Riveros, N. y Orrego, F. Activation of rat brain cortex calcium channels by excitatory aminoacids, en *Excitatory Aminoacids*. P. J. Roberts., J. Storm Mathisen, H. Bradford, Eds. Mac Millan (en prensa).

Orrego, F., Lagos, N., Riveros, N. y Valdes, L. F. (1986). Endogenous GABA: Presence in rat brain synaptic vesicles, release and postsynaptic effect, en *GABA and Endocrine Funtion*. Editado por G. Racagni y A. Donoso. Raven Press N.Y. 39-46.

I N T R O D U C C I O N

La transmisión de señales entre neuronas vecinas en el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados es un fenómeno eminentemente químico (Krnjević, 1974), en el que participan moléculas llamadas neurotransmisores, los que se encuentran almacenados y concentrados en el axón presináptico.

La mayor parte de los trabajos orientados a dilucidar el mecanismo mediante el cual un impulso eléctrico en el terminal presináptico induce la liberación del neurotransmisor se ha realizado en sistema nervioso periférico. Sin embargo, dada la semejanza estructural y biofísica de los axones y elementos presinápticos en el sistema nervioso central y en el periférico, se acepta que en ambos casos la liberación de neurotransmisores obedecería al mecanismo de secreción por exocitosis, descrito para vesículas y gránulos de almacenamiento presentes en diferentes tejidos (Douglas, 1968).

La exocitosis o fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática se origina al despolarizarse el terminal presináptico, por efecto del potencial de acción. Esta despolarización aumenta el flujo de iones calcio hacia el interior del axoplasma e induce la liberación del contenido de las vesículas al espacio extracelular. La interacción del transmisor con receptores postsinápticos modifica la actividad de las células receptoras y genera una respuesta específica (Katz y Miledi, 1967; Llinás y Nicholson, 1975).

Se han postulado numerosos compuestos, de estructura muy variada, como posibles neurotransmisores a nivel central. En general se ha considerado la presencia de una sustancia en el terminal presináptico y su capacidad para modificar la actividad neuronal como punto de partida para el estudio de su probable acción transmisora.

Los criterios básicos para la identificación de un neurotransmisor son:

1) Identidad de acción: La sustancia en cuestión, aplicada extracelularmente en la vecindad de la neurona, debe producir el mismo efecto postsináptico, con la misma velocidad y a través del mismo mecanismo que el transmisor natural (ref. en Orrego, 1979).

2) Liberación inducida: Al estimular fisiológicamente el axón presináptico el transmisor debe liberarse en proporción a la magnitud del estímulo y con dependencia absoluta del calcio extracelular (ref. en Orrego, 1979).

3) Localización vesicular: Se ha considerado que el neurotransmisor debe estar presente no sólo en la región presináptica sino, además, almacenado en vesículas sinápticas, donde se concentraría y estaría protegido de la degradación enzimática. Este último criterio se ha propuesto como esencial en la identificación de neurotransmisores centrales (Orrego, 1979).

Otros criterios que pueden considerarse complementarios a los ya citados son:

a) Antagonismo farmacológico: Los efectos postsinápticos del presunto neurotransmisor deben ser modificados por drogas, del mismo modo que el transmisor natural. Si una droga inhibe la transmisión en

una sinapsis y disminuye la eficiencia de una sustancia aplicada desde el exterior, se infiere que dicha sustancia puede ser el transmisor natural en esa sinapsis. Si el antagonista sólo bloquea la transmisión pero no el efecto de la sustancia aplicada, no se atribuye a ésta un rol como neurotransmisor.

b) La presencia en el terminal sináptico de un sistema enzimático capaz de sintetizar el presunto transmisor a partir de sus precursores, la presencia de un sistema de inactivación específico de su efecto y la distribución diferencial de un determinado compuesto en diferentes regiones del SNC, se han considerado también sugerentes de una función transmisora.

NATURALEZA DE LOS NEUROTRANSMISORES EXCITADORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

En comparación con el conocimiento que se tiene acerca de la transmisión inhibitoria en muchos niveles del SNC de mamíferos, en que se ha establecido con certeza que el ácido γ -aminobutírico (GABA) actuaría como neurotransmisor, los estudios del mecanismo de acción y la naturaleza de los neurotransmisores excitadores son menos concluyentes.

Se ha demostrado inequívocamente la función de la acetilcolina, que interviene en una pequeña fracción de las sinapsis excitadoras centrales en vertebrados. Se ha descrito además, el efecto excitador de ciertos péptidos como la sustancia P, colecistoquinina y péptido intestinal vasoactivo y de algunos aminoácidos como el ácido glutámico y el ácido aspártico.

A. GLUTAMATO Y ASPARTATO COMO NEUROTRANSMISORES.

El primer indicio de un posible papel de los aminoácidos ácidos en la transmisión central se encuentra en los trabajos de Hayashi y col. (ref. en Coyle, 1983), quienes describen el efecto convulsivante del glutamato y del aspartato al ser inyectados intraventricularmente en el cerebro. Con posterioridad, Curtis y col. (1959) demuestran la acción excitadora del glutamato y sus análogos sobre neuronas del SNC de mamíferos.

A continuación se analizan brevemente los antecedentes que sugieren una función transmisora central del glutamato y el aspartato y las dificultades técnicas y de interpretación inherentes a la identificación de un neurotransmisor. Uno de los problemas más serios y que será enfatizado donde corresponda, es la amplia participación de estos aminoácidos en el metabolismo celular y la incapacidad técnica para distinguir entre los compartimientos que tendrían relación con una u otra función.

1. DISTRIBUCION REGIONAL DE GLUTAMATO Y ASPARTATO EN EL SNC. El tejido nervioso de mamíferos posee un alto contenido de ácido glutámico y de ácido aspártico los que no están distribuidos uniformemente en el SNC, sino concentrados específicamente en ciertas poblaciones neuronales (Johnston, 1978). Esto ha llevado a postular ciertas áreas en las que la transmisión nerviosa estaría mediada por estos aminoácidos. Sin embargo, dado que la actividad metabólica y la función de diferentes áreas del SNC es muy distinta, no es sorprendente que exista esta variación regional. De hecho se ha observado en SNC de gato, un gradiente de concentración de glutamato que aumenta desde las zonas más

caudales a las cefálicas de la sustancia gris, el que se correlaciona con las variaciones en el consumo de oxígeno en estas áreas.

2. SISTEMA DE INACTIVACION SINAPTICA DE GLUTAMATO Y ASPARTATO. El mecanismo de inactivación de glutamato y aspartato en la sinapsis parece ocurrir fundamentalmente mediante un transporte rápido de ellos, desde la hendidura sináptica hacia el terminal presináptico, a través de un sistema de alta afinidad común para ambos (ref. Fagg y Lane, 1979, Fagg y Foster, 1983). Esta captación depende de la presencia de ión sodio.

Se ha observado una disminución de la captación de glutamato al lesionar los axones de ciertas vías en el SNC. Este hecho, sin embargo, no significa que esta vía sea glutamatérgica por cuanto esta lesión de los axones puede provocar cambios metabólicos importantes en la neurona y la alteración no se relacionaría necesariamente con una función transmisora (Storm Mathisen y Iversen, 1979; Henn y col., 1974; Balcar y Johnston, 1972).

3. LIBERACION INDUCIDA DE GLUTAMATO Y ASPARTATO. Uno de los criterios más importantes para establecer la naturaleza de un neurotransmisor es demostrar que la sustancia en cuestión se libera desde el axón presináptico en cantidad suficiente para activar la neurona postsináptica.

En este tipo de estudio se ha recurrido a la estimulación eléctrica o química de terminales nerviosos específicos, rebanadas finas de tejido o de sinaptosomas y a la recolección de la sustancia liberada por ellos.

Se postula que en el hipocampo las fibras comisurales y asociativas, que van a las células piramidales CA₄ del giro dentado, liberarían aspartato y las colaterales de Schaffer glutamato o aspartato (Fagg y Foster, 1983). Se ha observado que en cortes de hipocampo despolarizados con compuestos excitadores, se libera glutamato y aspartato con dependencia de calcio y que la estimulación con 40mM de KCl también produce liberación de estos compuestos (Ferkany y Coyle, 1983).

En cortes de corteza olfatoria de cuy, la estimulación eléctrica repetida de la aferencia excitadora, el tracto olfatorio lateral, aumenta la liberación de glutamato. Este efecto es específico, proporcional a la frecuencia del estímulo y dependiente de la presencia de Ca²⁺ en el medio (Yamamoto y Matsui, 1976). En cortes de corteza olfatoria de rata, se ha observado en cambio la liberación de aspartato (Collins y Probett, 1981).

Muchos de los trabajos de la literatura, que indican que en ciertas vías neuronales estos aminoácidos se liberan con las características propias de un neurotransmisor, requieren un análisis riguroso de las condiciones experimentales de estimulación usadas. La liberación debe ser selectiva y no ser consecuencia del daño tisular (Orrego, 1979).

En experimentos efectuados en rebanadas de corteza cerebral de rata se ha observado que cuando se aplican estímulos eléctricos con potenciales de alrededor de 1 V no se libera glutamato ni aspartato, en cambio al aplicar un potencial mayor, éstos se liberan conjuntamente

con lisina y leucina, que no tienen actividad en el SNC. En condiciones de alto voltaje hay salida de glutamato y aspartato desde el compartimento glial, lo mismo ocurre al estimular los cortes con una concentración alta de K^+ , cuyo efecto despolarizante se manifiesta a nivel neuronal y glial (Vargas y col., 1977).

Es indispensable demostrar si el proceso de liberación es absolutamente dependiente de calcio. Si la liberación ocurre con estímulos entre 0.5 y 1 V y es dependiente de calcio, es muy posible que el compuesto sea de origen neuronal y esté relacionado con una función transmisora.

Tomando en cuenta estas consideraciones, el glutamato y el aspartato no cumplirían, hasta el momento, con el criterio de liberación inducida.

4. IDENTIDAD DE ACCION: ACCION POSTSINAPTICA DE GLUTAMATO Y ASPARTATO. La aplicación iontoforética de glutamato en la vecindad de una célula receptora produce un efecto semejante al del neurotransmisor excitador natural.

Los resultados obtenidos mediante la técnica iontoforética, deben analizarse con atención, ya que a menudo se produce una alta concentración local de la sustancia aplicada, la que puede provocar una respuesta postsináptica característica, pero sin significado fisiológico. Existe además la posibilidad que la sustancia aplicada interactúe con receptores extrasinápticos e induzca la liberación del neurotransmisor natural responsable de la respuesta que se observa. Un enfoque experimental muy útil, para ver si una sustancia cumple con

el criterio de identidad de acción, es comparar el potencial de inversión de la respuesta provocada por el neurotransmisor natural con el de la respuesta provocada por la sustancia en cuestión, aplicada iontoforéticamente.

El potencial de inversión de la despolarización inducida por glutamato, en muchos estudios, es diferente al del potencial postsináptico excitatorio (ref. en Fagg y Foster, 1983).

5. INTERACCION DE GLUTAMATO Y ASPARTATO CON UN RECEPTOR DE MEMBRANA.

La medición de la unión de un compuesto radiactivo a membranas, permite evaluar directamente la interacción del ligando con su receptor, a diferencia de las técnicas electrofisiológicas que miden un evento que se supone es el resultado de esta interacción.

En los primeros estudios de unión de aminoácidos ácidos a membranas de SNC, se usó ^{14}C -glutamato y membranas de cerebro de rata (Roberts, 1974, Michaelis y col., 1974). En ellos se describe la unión de glutamato como un proceso saturable y de alta afinidad donde el ligando puede ser desplazado por otros aminoácidos excitadores, datos que sugieren la interacción del compuesto con un receptor específico.

A raíz de los estudios de Simon y col. (1976) que demuestran la unión específica de ^3H -kainato a membrana plasmática, se propuso este compuesto como un ligando ideal para el estudio del receptor de glutamato. El kainato posee un gran poder excitador sobre el SNC y no es captado por el sistema de transporte de glutamato. Sin embargo, posteriormente se observó que las interacciones de glutamato y kainato con membranas sinápticas presentaban diferentes características. De hecho la modificación química de la molécula de kainato en grupos que

no se relacionan con la estructura del glutamato, por ejemplo la reducción de la cadena isopropilénica, produce compuestos de menor actividad excitadora o completamente inactivos (Schwarcz y col, 1978). Por otra parte, los requerimientos iónicos para la unión de kainato, al igual que los necesarios para la despolarización neuronal en cerebro de mamíferos, son diferentes que para glutamato. También hay diferencias en la farmacología de los sitios de unión de ambos compuestos.

Al sintetizarse ^3H -glutamato de alta actividad específica, a pesar de la gran disparidad de datos que se obtuvieron, se avanzó considerablemente en la caracterización del receptor.

Las diferencias en los parámetros cinéticos de la unión se atribuyeron a los métodos de preparación de las membranas y a la diversidad de los tejidos usados, que provenían de distintas áreas del SNC y de distintas especies animales. Sin embargo, esto no explicaba la falta de especificidad farmacológica observada, por lo que se postuló la existencia de diferentes receptores para glutamato distribuidos diferencialmente en las áreas consideradas.

A partir de estudios cinéticos se postulan 3 sitios de unión para glutamato. Existirían dos sitios de afinidad media ($K_d = 100-1000 \text{ nM}$), que pueden separarse sobre la base de su sensibilidad farmacológica, dependencia de iones y un sitio de afinidad baja ($K_d > 1000 \text{ nM}$), dependiente de sodio y que posiblemente correspondería a un sitio de transporte (Foster y Fagg, 1984).

La información existente acerca de la unión de L-aspartato a membranas es escasa. Se ha descrito la existencia de dos sitios de

unión, uno de los cuales tiene requerimientos estructurales y de dependencia de iones semejante a uno de los sitios descritos para glutamato (ref. Foster y Fagg, 1984).

5.1. CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DEL RECEPTOR. La caracterización farmacológica del receptor para aminoácidos excitadores se postergó por años debido a la falta de antagonistas potentes y selectivos. Con el desarrollo de dichos compuestos la mayor parte de los trabajos electrofisiológicos y de estudio de unión se han orientado en este sentido y ha sido posible demostrar la existencia de por lo menos tres receptores diferentes que reconocen al L-glutamato, con una afinidad semejante y que estarían localizados en forma diferencial en el SNC (Watkins, 1984; ref. Foster y Fagg, 1984).

La clasificación expuesta a continuación deriva fundamentalmente de estudios electrofisiológicos en que se analizó el efecto de antagonistas sobre la respuesta inducida por la aplicación de un agonista que activa selectivamente a estos receptores.

i) RECEPTOR QUE UNE N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA). Este receptor está definido por su alta selectividad por el NMDA. Es antagonizado por análogos del ácido fosfónico como el D-2-amino-5-fosfonopentanoato, el D-2-amino-7-fosfonoheptanoato y el 3-(2-carboxipiperazin-4-il)-propil-1-fosfonato, compuestos muy potentes y selectivos.

Este receptor es el mejor caracterizado fisiológicamente y se postula que no participaría en la transducción de señales rápidas sino en procesos relacionados con plasticidad neuronal.

La despolarización neuronal inducida por NMDA en presencia de Mg^{2+} , es dependiente de voltaje. Cuando la membrana neuronal está en

su potencial de reposo o en valores menores, los canales activados por NMDA son bloqueados por concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} .

Existen estudios autoradiográficos que muestran la presencia indiscutible de receptores de NMDA en el SNC, sin embargo aunque hace años que existe el 3H -NMDA de alta actividad específica, no se ha logrado establecer las condiciones apropiadas para el estudio de su unión a membranas. Se ha postulado que este sitio uniría aspartato en forma preferencial (Watkins y Evans, 1981; ref. en Foster y Fagg, 1984).

ii) RECEPTOR QUE UNE QUISCUALATO. Este tipo de receptor es activado selectivamente por el ácido quiscualico. Electrofisiológicamente no es afectado por Mg^{2+} , ni por los antagonistas del receptor de NMDA. No se ha descrito hasta ahora unión de quiscualato a receptores de membranas pero hay trabajos en relación a la unión del ácido 3H -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico a membranas de cerebro de rata. Este compuesto es un análogo cíclico del L-glutamato y un excitante poderoso de neuronas espinales de mamíferos. Se piensa que su acción estaría mediada por receptores de tipo quiscualato (ref. en Foster y Fagg, 1984).

iii) RECEPTOR QUE UNE KAINATO: La falta de antagonistas selectivos para este receptor ha retrasado considerablemente su estudio, impidiendo su caracterización farmacológica y la interrelación entre los estudios fisiológicos y los de unión.

La unión de 3H -kainato a receptores de membrana de cerebro de rata es específica del tejido nervioso, saturable, de alta afinidad e independiente del ión Na^+ (Simon y col., 1976).

El kainato constituye un compuesto con un espectro de actividad único, ya que en concentración milimolar es prácticamente incapaz de desplazar al L-glutamato y L-aspartato de su unión a membranas, pero cuando él está unido es desplazado por quisqualato y glutamato.

No se han desarrollado antagonistas que discriminen claramente entre los receptores de kainato y quisqualato, ambos son antagonizados por la δ -D-glutamilglicina y el δ -D-glutamilaminometilsulfonato, con moderada selectividad y potencia.

Mediante estudios autoradiográficos y usando ácido ^3H -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico y ^3H -KA, se ha demostrado la distribución anatómica de ambos receptores en el cerebro (Monaghan y col., 1983).

Se postula que los receptores de quisqualato y kainato serían los mediadores primarios de señales excitadoras rápidas en sinapsis que utilizan aminoácidos excitadores como transmisores.

6. PRESENCIA DE GLUTAMATO Y ASPARTATO EN VESICULAS SINÁPTICAS. La presencia en el terminal sináptico de altas concentraciones de numerosos compuestos, que son incapaces de modificar la actividad neuronal, ha desvirtuado los estudios que consideraban la localización presináptica como indicativa de una función transmisora.

No puede desconocerse la posibilidad de que existan diferentes mecanismos de liberación para los distintos agentes neuroactivos que coexisten en el mismo terminal nervioso y que cada uno de ellos tenga su propia regulación. Sin embargo, el modelo de liberación de los neurotransmisores por exocitosis desde vesículas sinápticas, aunque oscuro a nivel bioquímico, sigue siendo el de mayor aceptación por

cuanto explica y compatibiliza la mayor parte de los hallazgos experimentales existentes (Whittaker, 1984; Tauc, 1982).

Se han realizado grandes avances tanto en las técnicas de aislamiento como en el estudio de la composición y función de las vesículas sinápticas, sin embargo, la mayoría de estos estudios no se han hecho en sistema nervioso de mamíferos (Whittaker, 1984). Una de las razones radica en la dificultad para obtener un tejido que posea una población homogénea de vesículas que contengan un determinado transmisor. Junto al problema de la diversidad de terminales nerviosos que conducen a una población mixta de vesículas, está también el de la contaminación de las preparaciones con fragmentos resellados de membrana plasmática, de membranas de otros organelos celulares y de retículo endoplásmico.

Se ha determinado una alta concentración de glutamato en los sinaptosomas de diferentes áreas de cerebro de bovino (Kontro y col. 1980), de bulbo olfatorio y de cerebro total de rata (Kvamme y Lenda, 1981).

La concentración de aspartato en la fracción sinaptosomal de cerebro de bovino también es alta, pero 3 a 4 veces menor que la del glutamato (Kontro y col., 1980).

En la fracción de vesículas sinápticas en cambio, no se ha encontrado que los ácidos glutámico y aspártico esten en cantidad significativamente mayor que el resto de los aminoácidos, ni tampoco que sean más abundantes que en otras fracciones subcelulares (Mangan y Whittaker, 1966; Rassin, 1972; Kontro y col, 1980; De Bellerocche y Bradford, 1973; Lähdesmäski y col., 1977).

Se postuló por lo tanto que estos compuestos, al igual que otros transmisores, podrían estar localizados en el citoplasma y ser liberados directamente a la hendidura sináptica a través de un transportador en la membrana externa (ref. en Whittaker, 1984; De Belleruche y Bradford, 1973).

Otros autores atribuyen la ausencia de los aminoácidos en las vesículas a una pérdida del contenido de ellas durante el proceso de preparación, el que incluye largas centrifugaciones y numerosos lavados. Este hecho ha sido confirmado en los trabajos de Naito y Ueda (1985) y de Kvamme y Lenda (1981).

Una de las primeras pruebas acerca de la compartimentalización del glutamato aparece en un trabajo en que miden su concentración en sinaptosomas intactos y en sinaptosomas rotos mediante sonicación. Los autores demuestran que aproximadamente el 12% del glutamato presente en el sinaptosoma es liberado cuando éste se rompe y sugieren que el resto estaría compartimentalizado en alguna estructura que podría corresponder a las vesículas sinápticas (Kvamme y Lenda, 1981).

Los trabajos más concluyentes en relación a la presencia de glutamato en vesículas sinápticas han aparecido en los últimos cuatro años. El primero de ellos, que forma parte de esta tesis, demuestra que existe glutamato en vesículas sinápticas de corteza cerebral, cuerpo estriado e hipotálamo de rata (Riveros y Orrego, 1982). Posteriormente, Naito y Ueda (1983 y 1985) mediante técnicas inmunológicas purifican vesículas sinápticas de corteza cerebral de buey y demuestran la presencia en ellas de un sistema de captación específico para glutamato, el que depende de ATP y temperatura y es independiente de Na^+ .

Casi simultáneamente con este hallazgo, mediante técnicas inmunocitoquímicas se tuvo la prueba de que el glutamato está concentrado en forma significativa en terminales axónicos excitadores de hipocampo de rata, región que contiene sistemas neuronales bien definidos que se piensa que utilizan glutamato como transmisor excitador (Storm Mathisen y col., 1983).

Hasta ahora no existen datos similares en relación a la presencia de aspartato en vesículas sinápticas, a pesar de lo cual aún no se ha descartado la posible participación del aminoácido como neurotransmisor en el SNC de mamíferos (Fagg y Lane, 1979; ref. en Foster y Fagg, 1984).

B. N-ACETILASPARTILGLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISOR.

Se ha observado que la aplicación de glutamato y aspartato provoca una respuesta neuronal que no es antagonizada por las mismas drogas que antagonizan el efecto del neurotransmisor excitador natural de las vías en que ellos supuestamente actúan (Fagni y col., 1983a; Shields y col., 1981). Por esta razón se ha postulado que el neurotransmisor podría corresponder a una sustancia que presenta gran analogía con estos aminoácidos o que contiene glutamato o aspartato o ambos en su estructura.

Se ha propuesto que la sustancia excitadora liberada en neuronas de vías presuntamente glutamatérgicas podría ser el ácido N-acetilaspartilglutámico. Este dipéptido se encuentra en alta concentración en el tejido nervioso de todas las especies de mamíferos estudiadas y presenta una distribución regional en el cerebro

(Curatolo y col., 1965; Miyamoto y Tsujio, 1967; Ffrench-Muller y col., 1985; Koller y Coyle, 1985).

El NAAG se une en forma saturable y reversible a membranas sinaptosomales de cerebro de rata y es desplazado por quisqualato, ibotenato y glutamato (Koller y Coyle, 1985), a su vez es capaz de desplazar con mayor eficiencia que otros análogos peptídicos la unión de glutamato (Koller y Coyle, 1984).

A diferencia de lo que ocurre con glutamato, en corteza piriforme de rata se ha observado que el D,L-2-amino-4-fosfonobutirato es capaz de inhibir tanto el efecto excitador del NAAG como el producido por el neurotransmisor endógeno liberado por estimulación de las vías aferentes excitadoras (Shields y col., 1981; Ffrench-Muller y col., 1985).

La infusión estereotáxica de NAAG en hipocampo de rata produce convulsiones sólo después de un largo período de latencia (Koller y Coyle, 1984).

Todos estos antecedentes sugieren una participación del NAAG en la neurotransmisión. Parte del trabajo de esta tesis, orientada a la identificación de una sustancia excitadora que interactúe con el receptor que une glutamato, tiene relación con el NAAG y su posible función transmisora (Riveros y Orrego, 1984).

C. METILTETRAHIDROFOLATO Y SU FUNCION EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

A pesar del gran interés en torno al receptor que une kainato, hasta el momento en que se comenzó esta tesis no se había logrado establecer su significado fisiológico, ni la naturaleza del ligando endógeno que se une a él.

Se ha propuesto que este compuesto podría ser el glutamato o algún derivado del tetrahidrofolato, ya que estos compuestos desplazan la unión de kainato a membranas de cerebelo de rata. El metiltetrahidrofolato posee efecto excitador en médula espinal de sapo y es captado activamente en cerebro de rata, donde se encuentra concentrado en sinaptosomas (Ruck y col., 1980).

Sin embargo, existen numerosos antecedentes que indican que la acción del folato no es a nivel del receptor de kainato. Se ha descrito que el compuesto actúa como agonista del kainato en la médula del sapo y como antagonista en neuronas espinales de rata. El kainato y los folatos no tienen el mismo efecto sobre el nivel de 3',5'-guanosínmonofosfato, ya que en presencia de kainato aumenta el nivel del nucleótido, en cambio éste no se modifica por acción de los folatos. La diferente sensibilidad de la corteza olfatoria frente a ambas sustancias tampoco es compatible con la acción de los dos compuestos a nivel del mismo receptor.

Tanto el folato como el kainato son neurotóxicos. Se ha descrito que la inyección de folatos en la amígdala de rata adulta reproduce los efectos tóxicos del kainato y en el cuerpo estriado induce convulsiones (Olney y col., 1981a). Sin embargo, el efecto del MTHF no es comparable con el de kainato en cuanto a la localización del daño tisular ni tampoco en cuanto al curso temporal de la degeneración neuronal (Olney y col., 1981b).

Para compatibilizar las discrepancias observadas en los experimentos electrofisiológicos, se ha postulado la existencia de dos tipos de receptores de kainato, uno sensible a kainato solamente y otro activado por kainato y folatos (Auker y col., 1982).

La naturaleza del ligando endógeno para el receptor que une kainato seguiría siendo una incógnita y su determinación constituye uno de los objetivos primordiales de esta tesis (Riveros y Orrego, 1981).

ACCION NEUROTOXICA DE AMINOACIDOS EXCITADORES

La aplicación iontoforética de aminoácidos dicarboxílicos produce excitación neuronal en el SNC. Este efecto se observa también cuando se administran análogos estructurales de los ácidos glutámico y aspártico tales como los ácidos quisquálico, homocisteico, N-Metil-D,L-aspártico iboténico, domoico y kaínico.

Todas estas sustancias producen destrucción celular caracterizada por alteraciones de las dendritas y del soma neuronal, sin afectar los axones. La localización del daño es coincidente con la de los receptores para sustancias excitadoras (Mc Geer y Mc Geer, 1976).

El efecto neurotóxico del glutamato y del aspartato fue descrito por Lucas y Newhouse en 1957 (ref. en Coyle, 1983), quienes observaron que la inyección de estos aminoácidos a ratones recién nacidos producía daño en la retina. Desde entonces ha aparecido una serie de trabajos orientados a dilucidar el mecanismo mediante el cual se produce la destrucción neuronal. Los estudios se han realizado inyectando glutamato o sus análogos en áreas específicas del cerebro y cerebelo de animales adultos y observando los cambios que se producen a nivel bioquímico, histológico y electrofisiológico.

Todos los aminoácidos citados producen daño neuronal, sin embargo, el más estudiado ha sido el ácido kaínico por constituir una herramienta de lesión selectiva de ciertas vías neuronales y además porque existe gran analogía entre el daño producido por la administración de esta toxina y el que se observa en numerosas enfermedades neurodegenerativas (Olney y col., 1974). Es así como la inyección intraventricular de kainato en cerebro de rata produce un cuadro convulsivo con degeneración neuronal del sistema límbico semejante al que resulta como consecuencia del estatus epiléptico (ref. en Nadler, 1981). Se ha demostrado también un paralelismo entre los efectos neuroquímicos e histológicos producidos por la inyección de kainato en cuerpo estriado y los que se presentan en la corea de Huntington (ref. en Coyle, 1983).

La causa de estas patologías podría resultar de una alteración en los mecanismos de regulación del metabolismo y de la liberación del neurotransmisor endógeno que se une a los mismos receptores que unen kainato o bien, a la síntesis de una toxina análoga al kainato que sensibilizaría a las células frente a la acción de otras sustancias excitadoras.

Olney y col. (1971) han demostrado que el efecto neurotóxico del glutamato y sus análogos generalmente se correlaciona con su potencia excitadora y que la sensibilidad neuronal frente a la acción tóxica de estos compuestos es proporcional a la densidad de receptores para glutamato presentes en la célula.

Se ha observado que la inyección intracerebral de kainato, en hamster, destruye todas las células de la corteza cerebelosa que poseen receptores que unen glutamato, manteniéndose intactas las células granulares que no los poseen (Herndon y col., 1980).

Se ha postulado por lo tanto, que el daño neuronal derivaría de la estimulación sostenida de los receptores para glutamato. La despolarización neuronal prolongada llevaría a un desbalance iónico irreversible, a un agotamiento de las reservas energéticas y finalmente a la destrucción celular (ref. en Coyle 1983).

Nadler y col. (1981) han postulado que la acción neurotóxica del kainato residiría en su capacidad para inducir convulsiones y que la vulnerabilidad de las células piramidales de hipocampo frente a la acción de la droga se debería al bajo umbral de descarga de estas células. Esta idea surge de observaciones que muestran la relación entre la intensidad de las convulsiones en una crisis epiléptica y el daño cerebral que se produce. Experimentalmente la destrucción neuronal sólo se manifiesta al aplicar la dosis de kainato que produce convulsiones ininterrumpidas durante 2 horas. Por otra parte el efecto tóxico del glutamato y sus análogos se reduce al coadministrar drogas anticonvulsivantes.

Hay estudios que muestran que la neurotoxicidad del kainato depende de la integridad de las fibras excitadoras aferentes que posiblemente liberan glutamato o aspartato (Biziere y Coyle, 1978; Mc Geer y col., 1978).

Ferkany y col. (1982) proponen que el kainato interactuaría con

receptores presinápticos despolarizando el terminal, lo que provocaría la liberación de glutamato, aspartato o de ambos. El compuesto liberado y el kainato activarían cooperativamente a receptores postsinápticos, despolarizando la célula en forma mantenida, hasta provocarle la muerte. Al parecer el daño no se debería a la despolarización per se, sino a la duración del estímulo despolarizante. Se ha observado, por ejemplo, que en músculo esquelético de langosta incubado en un medio con alto contenido de K^+ , se produce despolarización sin degeneración neuronal, a diferencia de lo que ocurre cuando se despolariza con glutamato (ref. en Coyle, 1983; Duce y col., 1983).

EFFECTO DE AMINOACIDOS ACIDOS SOBRE LA PERMEABILIDAD CELULAR Y SU POSIBLE RELACION CON EL MECANISMO DE NEUROTOXICIDAD.

La despolarización por acción de los aminoácidos ácidos provoca variaciones transitorias de la conductancia iónica. Se ha descrito que al incubar cortes de corteza y de cuerpo estriado de rata en soluciones salinas, con concentraciones milimolares de glutamato, se produce un aumento de la entrada de agua y de sodio y una disminución de los niveles de potasio y de las reservas energéticas de la célula. El kainato sólo afecta el movimiento de sodio y el N-metil-D,L-aspartato los flujos de sodio y agua, sin modificar el nivel de ATP (Bradford y McIlwain, 1966; Biziere y Coyle, 1978; Harvey y McIlwain, 1968; Nicklas y col., 1980).

En cortes de hipocampo se ha demostrado que la despolarización eléctrica o química de las células piramidales CA₁ produce una disminución de la actividad del calcio extracelular. Al aplicar aminoácidos excitadores también se ha observado que los cambios en la conductividad del ión calcio son cuantitativamente importantes.

Hay muchos datos que relacionan el aumento del calcio intracelular con la toxicidad y muerte de una variedad de tejidos y células animales. Esta relación se ha observado en estudios realizados en hígado, corazón y riñón (Farber, 1981).

En el sistema nervioso se ha descrito la degradación de estructuras neuronales por acción de fosfolipasas y proteasas dependientes de calcio (Pontremoli y Melloni, 1986). Estas enzimas al activarse, pueden alterar proteínas estructurales de la membrana mitocondrial y plasmática y de éste modo romper la homeostásis celular (Farber, 1981).

En músculo esquelético de langosta, en que se ha inhibido la desensibilización de los receptores de glutamato, se ha observado que el L-glutamato produce hinchamiento y vacuolización celular siempre que exista Ca^{2+} en el medio extracelular (Duce y col., 1983). El mecanismo mediante el cual los aminoácidos ácidos producen un aumento de la entrada de calcio a la célula nerviosa no está claro. El efecto podría deberse a una acción directa de estos compuestos sobre un receptor específico asociado a un canal de calcio o ser consecuencia de la despolarización por aumento de la entrada de sodio a la célula, la que provocaría la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje.

Parte de esta tesis comprende un estudio acerca del efecto de varias sustancias excitadoras sobre la entrada de calcio al espacio intracelular de cortes de corteza cerebral de rata y de su posible relación con el efecto neurotóxico que presentan. Se trató además de determinar la naturaleza del canal de calcio involucrado en este efecto.

EFFECTO DE SUSTANCIAS DEPRESORAS DEL SNC SOBRE EL FLUJO DE CALCIO.

Se ha descrito que sustancias depresoras del SNC, como el pentobarbital, la morfina y el etanol disminuyen la entrada de calcio al terminal nervioso e interfieren el fenómeno de excitación neuronal. Estas sustancias podrían tener un efecto directo sobre los canales de calcio o una acción inespecífica sobre ellos al provocar un cambio en la fluidez de la membrana plasmática, el que alteraría indirectamente la funcionalidad del canal. Se ha observado que el etanol aumenta la fluidez de la bicapa lipídica y el pentobarbital la disminuye.

En sinaptosomas de cerebro de rata el pentobarbital reduce la entrada de calcio producida por despolarización con K^+ (Blaustein y Ector, 1975) y en preparaciones de músculo de invertebrado disminuye la sensibilidad de las células postsinápticas a la acción de acetilcolina, glutamato y otros compuestos excitadores (Barker y Gainer, 1973).

La adición de etanol a sinaptosomas de cerebro de rata inhibe la captación de calcio dependiente de voltaje en distinto grado según sea el área en estudio. El efecto depresor del etanol, por otra parte es antagonizado por el suministro de calcio (Mayer y col., 1980). Se ha postulado que la acción depresora de los barbitúricos y de los alcoholes alifáticos podría deberse a perturbaciones en el mecanismo de activación de los receptores para aminoácidos excitadores (Teichberg y col., 1984) de hecho, el pentobarbital impide la acción neurotóxica del kainato inyectado intracerebralmente (Potashner y Gerard, 1983).

Los péptidos opioides y la morfina, por su parte, antagonizan la acción excitadora del glutamato en células de médula espinal (Zieglgänsberger y Bayerl, 1976)

EFECTO DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS DEL SNC SOBRE EL FLUJO DE CALCIO.

ADENOSINA: La adenosina y los nucleótidos de adenina tienen acción inhibitoria sobre neuronas de corteza cerebral, núcleo caudado, corteza olfatoria e hipocampo de rata (Proctor y Dunwiddle, 1983, Fredholm y Hedqvist, 1980). La adenosina inhibe la captación de calcio estimulada por K^+ y al ser aplicada iontoforéticamente disminuye la descarga espontánea de neuronas corticales en cerebro de rata. Por su parte los análogos de adenosina bloquean reversiblemente las espigas de calcio en células de ganglio cervical superior de rata y en neuronas piramidales de hipocampo. Se piensa que el efecto inhibitor de la adenosina derivaría de la disminución del flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la neurona, lo que disminuiría la liberación de neurotransmisores. De hecho se ha observado que el nucleósido inhibe la liberación de glutamato, acetilcolina y noradrenalina, inducida por despolarización con K^+ (ref. en Dolphin., 1983).

ACIDO γ -AMINOBUTIRICO: El GABA reduce la excitabilidad y actividad espontánea de la célula nerviosa cuando actúa a nivel del soma y disminuye el potencial de acción y la liberación de transmisores cuando lo hace a nivel del terminal presináptico.

En el SNC este aminoácido reduce la despolarización inducida por alta concentración de K^+ , lo que afecta la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Se ha establecido que la aplicación iontoforética de GABA bloquea la respuesta excitadora provocada por glutamato, aspartato y por sus análogos estructurales (Olney y Price, 1980).

Estos datos y otros que aparecen en la literatura sugieren una posible relación entre la acción inhibitoria de estos compuestos y su capacidad para modificar los flujos de calcio en neuronas centrales.

OBJETIVOS DE LA TESIS.

1. Determinar la naturaleza de la o las sustancias endógenas contenidas en vesículas sinápticas que se unen al mismo receptor que el kainato o el N-metil-D,L-aspartato.

Se postula que la sustancia buscada, relacionada estructuralmente con el kainato o el N-metil-D,L-aspartato podría corresponder a un neurotransmisor excitador y debiera estar concentrada en vesículas sinápticas al igual que los neurotransmisores clásicos.

2. Estudiar los mecanismos iónicos involucrados en la acción neurotóxica del glutamato y sus análogos estructurales, sobre neuronas centrales.

MATERIALES Y METODOS

1.-ANIMALES Y REACTIVOS:

Se usaron ratas Sprague Dawley, provenientes del vivero del departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.: Adenosina, serina, treonina, seroalbúmina bovina, HEPES, Sepharose 4-B, ATP y los ácidos L-aspártico, N-acetil-L-aspártico, δ -aminobutírico, L-glutámico, homocisteico, iboténico, kaínico, N-metil-D,L-aspártico y α -metil-D,L-aspártico.

Los ácidos G- 3 H-kaínico, L- U - 14 C-glutámico, 3 H-N-metil-D,L-aspártico y 14 C-aspártico y también el 45 Ca Cl₂, la 3 H-G -inulina y el PPO de New England Nuclear, Boston, MA, U.S.A, o de The Radiochemical Center, Amersham, Buckinghamshire, U.K.

Los solventes orgánicos sales inorgánicas, sacarosa, glucosa y Tris se obtuvieron de Merck, Darmstadt, Alemania.

Las placas de celulosa se adquirieron a Eastman Organic Chemicals, Rochester, U.S.A. El papel cromatográfico Whatman y el Sephadex G-10 a Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia.

2.-PREPARACION DE MEMBRANAS SINAPTICAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.

Se usaron ratas de 150-300 g las cuales se mataron por decapitación, disecándose luego la corteza cerebral. Las membranas se prepararon de acuerdo al método propuesto por Simon y col. (1976).

El método consiste en homogeneizar el tejido en 20 volúmenes de sacarosa 0,32 M en un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio con vástago de Teflon (clearance de 0,25 mm). El homogeneizado se centrifugaba por 10 min a 1000 x g, se descartaba el precipitado (P_1) y el sobrenadante (S_1) se centrifugaba a 20.000 x g por 20 min obteniéndose un sedimento (P_2) que se resuspendía en 10 volúmenes de agua destilada fría y se centrifugaba a 8000 x g por 20 min. El sobrenadante más la capa "algodonosa" del precipitado se centrifugaban a 48.000 x g por 20 min. El precipitado obtenido (P_3) se lavaba dos veces resuspendiéndolo en agua destilada y centrifugándolo a 48.000 x g por 20 min. Esta preparación cruda de membranas sinápticas fue la que se usó para los ensayos de unión de ligandos. Todas las manipulaciones descritas se realizaron entre 0 y 4°C.

3.-ESTUDIO DE LA UNION DE ^3H -KAINATO A MEMBRANAS SINAPTICAS.

3.1.-ENSAYO: La unión de ^3H -kainato (^3H -KA) se ensayaba por triplicado, de acuerdo al método descrito por Simon y col. (1976). Las membranas, 0,5- 1,5 mg de proteína, se incubaban por 20 min a 4°C en 2 ml de una mezcla de reacción compuesta por solución amortiguadora Tris-citrato 0,05M, pH 7,1 y 40nM de ^3H -KA, en ausencia y presencia de kainato frío 10^{-4} M. Al finalizar la incubación la reacción se detenía centrifugando los tubos por 10 min a 48.000 x g y a 4°C . El sobrenadante se descartaba, el sedimento se lavaba superficialmente dos

veces con 10 ml de agua bidestilada fría y se secaban las paredes de los tubos. Las membranas se solubilizaban durante la noche, a temperatura ambiente, con 0,6 ml de Protosol. El solubilizado se vaciaba en un frasco de conteo con mezcla de M-fluor concentrado, completándose a 5 ml con tolueno y se medía la radiactividad en un contador de centelleo (Tracor Analytic DELTA 300).

La unión específica de ^3H -KA se obtenía por diferencia entre la radiactividad unida a las membranas en ausencia de kainato frío (unión total) y la radiactividad unida en presencia de 10^{-4}M de kainato.

El kainato no radiactivo y el ^3H -KA compiten por unirse a un número finito de receptores de alta afinidad y también por unirse a un número ilimitado de sitios de unión de muy baja afinidad. La unión a los sitios de baja afinidad, que no es saturable, constituye un blanco y se denomina unión inespecífica. Se considera como unión específica el valor que corresponde al isótopo desplazado en presencia de una gran cantidad del mismo compuesto frío (Burt, 1978).

El ensayo se realizaba en solución amortiguadora sin sodio a baja temperatura para eliminar la posibilidad de unión de ^3H -KA a sitios de captación dependientes de sodio. La concentración de kainato usado limita la unión del ligando a enzimas que generalmente tienen una K_m del orden micromolar.

3.2.-ESTABILIZACION DE LOS RECEPTORES PARA KAINATO. En los primeros ensayos se usaron solamente membranas frescas, ya que el receptor de kainato se inactivaba rápidamente cuando las membranas se guardaban congeladas a -20°C ($t^{1/2}=12$ h). Dado que la preparación de membranas habitualmente demoraba entre 5 y 6 horas, se ensayaron varios métodos tendientes a estabilizar la unión del kainato a membranas almacenadas en frío. Algunos de los procedimientos usados se indican en la Tabla 1.

Puede observarse que la sonicación produce un aumento considerable de la unión específica de kainato en relación a las membranas sin sonicar. La preincubación de membranas frescas sonicadas por 30 min a 37°C no se tradujo en aumento de la unión del kainato a su receptor, a diferencia de lo que ocurre con el receptor de glutamato (Roberts, 1974b).

El tratamiento de las membranas con tritón X-100 al 0,05% seguido de varios lavados con agua eliminó completamente la unión de $^3\text{H-KA}$ a los receptores (no se muestra).

Las membranas sonicadas, almacenadas por 48 h a -20°C perdieron alrededor de 79 % de su capacidad para unir kainato en forma específica. El almacenamiento a -70°C llevó a la pérdida de un 63,5% de la unión en 48 h. Los mejores resultados se consiguieron cuando las membranas sonicadas se almacenaban liofilizadas y a -20°C . En estas condiciones los receptores conservaron un 52% de su capacidad de unión, aún después de 80 días de almacenamiento. Puede observarse además que la unión inespecífica disminuyó considerablemente en relación a la que se obtuvo con membranas frescas o almacenadas sin liofilizar. De acuerdo a estos resultados, todos los estudios de unión se

T A B L A 1

EFFECTO DE DIFERENTES PROCEDIMIENTOS SOBRE LA UNION DE ³H -KA
 A MEMBRANAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA

TRATAMIENTO		UNION			
Sonicación 60 s	Almacenamiento	Específica (E)		No específica (NE)	
		fmoles/mg proteína	%	fmoles/mg proteína	$\frac{NE}{E}$
-	-	354 ± 4,7 (3)	26,0	1574 ± 3,7 (3)	4,4
+	-	1316 ± 6,7 (3)	100,0 (*)	2703 ± 162 (3)	2,0
Sin liofilizar					
+	48 h a 4°C	284 ± 11,0(3)	20,9	2206 ± 9,5 (3)	7,7
+	16 h a -20°C	143 ± 6,2 (3)	10,5	765 ± 3,2 (3)	5,3
+	5 días a -20°C	140 ± 3,7 (3)	10,3	793 ± 10,0(3)	5,6
+	48 h a -70°C	497 ± 15,0(3)	36,5	2097 ± 12,3(3)	4,2
Liofilizadas					
+	24 h a -20°C	1150 ± 37,0(3)	85,0	1320 ± 57,0(3)	1,1
+	15 días a -20°C	1077 ± 42,0(3)	79,0	1311 ± 42,0(3)	1,2
+	80 días a -20°C	711 ± 20,0(3)	52,0	1245 ± 37,0(3)	1,7

Se consideró 100% la unión específica que se obtuvo al hacer el ensayo usando membranas frescas, sonicadas (*).

realizaron con membranas sonicadas y almacenadas como polvo liofilizado a -20°C .

La unión inespecífica, en todos los casos, fue bastante alta en relación a la unión específica. Esto podría deberse a que al centrifugar las membranas queda agua y $^3\text{H-KA}$ atrapados en el sedimento.

4. ESTUDIO DE LA UNIÓN ESPECÍFICA DE $^3\text{H-N-METIL-D,L-ASPARTATO}$ A SU RECEPTOR DE MEMBRANA

Las membranas preparadas de acuerdo al método de Simon y col., (1976) se incubaban en 2 ml de una mezcla compuesta por amortiguador Tris citrato 50 mM, pH 7,4 y 10 nM de $^3\text{H-NMDA}$, en presencia y ausencia de concentraciones variables de NMA o aspartato frío (10^{-8} a 10^{-1} M).

Cuando se usaron membranas de corteza cerebral el estudio de unión se hizo en las siguientes condiciones: a) membranas frescas, liofilizadas o tratadas con Triton X-100 al 0,05%. b) membranas preincubadas a 37°C y lavadas exhaustivamente. c) incubación por 20 o 60 min a 4°C . d) incubación por 20 min a 37°C y e) membranas preparadas en presencia de EDTA 3 mM .

Estos mismos ensayos se realizaron utilizando membranas de médula espinal de rata preparadas también por el método de Simon. Estas membranas se usaron 2 días después de su preparación y se almacenaron liofilizadas y a -20°C hasta el momento de usarlas.

5. CONTROL DE PUREZA DE LAS SUSTANCIAS RADIATIVAS.

5.1. ACIDO $^3\text{H-KAINICO}$: se controló la pureza del $^3\text{H-KA}$ mediante cromatografía en capa fina de celulosa usando como solvente una mezcla de butanol: ácido acético: agua (4:1:1). Se reveló con I_2 y se verificó la comigración de $^3\text{H-KA}$ y KA como una sola mancha en el cromatograma.

5.2. ACIDO ^3H -NMDA: Se realizó en paralelo una cromatografía en capa fina de celulosa de los ácidos N-acetil-L-aspartico, N-metil-D,L-aspartico no radiactivos y de ^3H -NMDA, usando como solvente de corrida una mezcla de n-butanol: agua: ácido acético (12:5:3). Se verificó la comigración de NMDA y ^3H -NMDA revelando una tira del cromatograma con I_2 y midiendo la radiactividad de los eluidos en la otra.

6.-PREPARACION DE VESICULAS SINAPTICAS.

Las ratas se mataban por decapitación, disecándose luego el área a estudiar. En algunos experimentos las vesículas se preparaban de acuerdo al método descrito por Hata y col. (1976) y en otros de acuerdo al método propuesto por Seidler y col. (1977).

6.1. METODO DE HATA (Fig. 1): Se homogeneizaba el tejido en 10 volúmenes de sacarosa 0,32 M mediante un homogeneizador de vidrio con vástago de teflón, a una velocidad de 400 a 600 rpm. El homogeneizado se centrifugaba a 1000 x g por 10 min, el sobrenadante (S_1) se centrifugaba a 10.000 x g por 40 min para obtener la fracción mitocondrial P_2 , que incluye los terminales sinápticos.

El precipitado P_2 se resuspendía en agua destilada (3 ml/g de tejido original) y se centrifugaba a 10.000 x g por 40 min. El sobrenadante traslúcido (S_2) se guardaba y el sedimento más la fase "algodonosa" (P_3) se resuspendían en agua y se volvían a centrifugar a 10.000xg por 40 min. El sobrenadante (S_3) se unía a (S_2) y se centrifugaban a 105.000xg por 40 min en una centrífuga Beckmann. El precipitado resultante correspondía a una fracción enriquecida en vesículas sinápticas (VS). Toda la preparación se realizaba usando agua bidestilada, hervida y filtrada por filtros de Millipore HAWP (25 mm 0,45 μm).

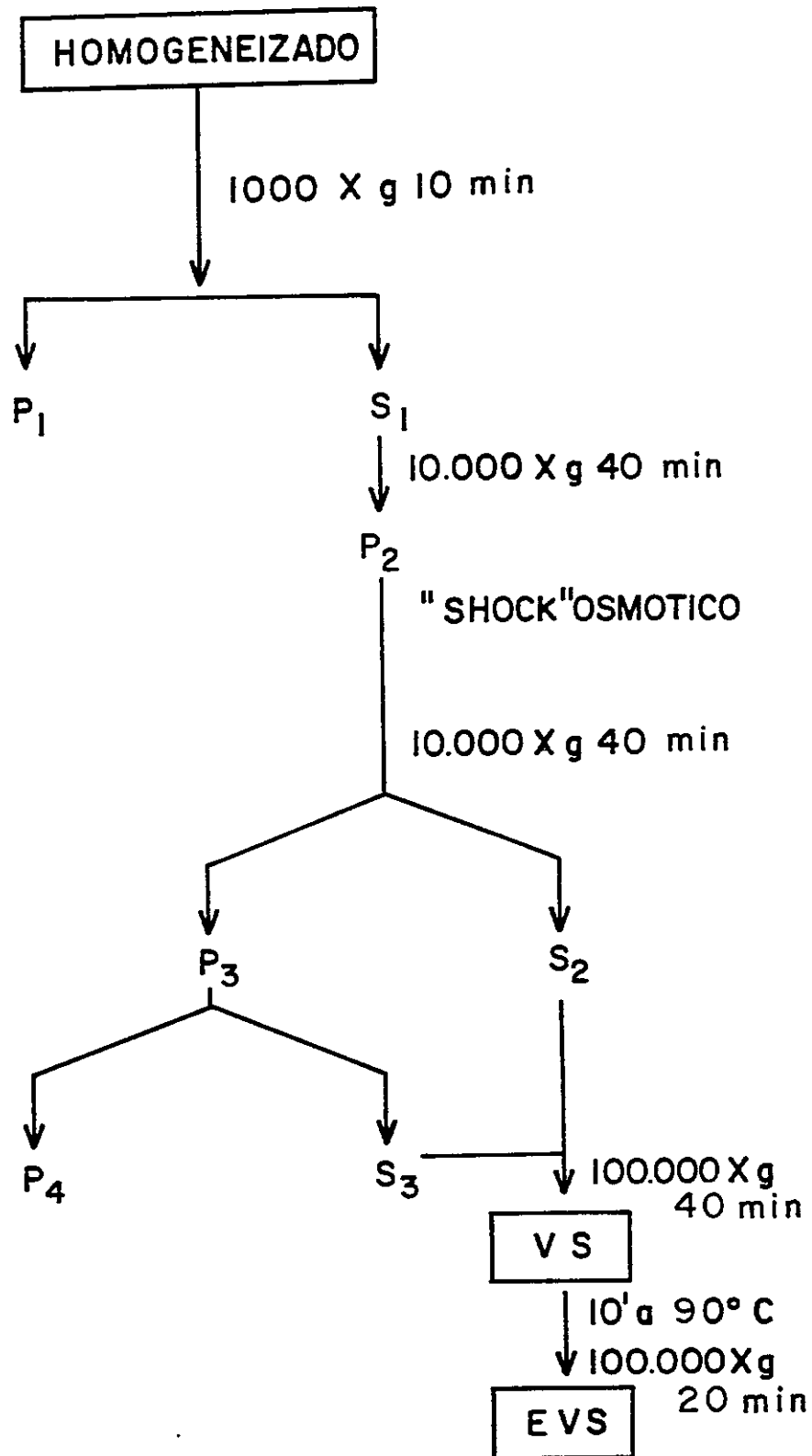


Figura 1. PREPARACION DE VESICULAS SINAPTICAS POR EL METODO DE HATA EXTRACCION DEL CONTENIDO VESICULAR. (P₁) restos celulares y núcleos; (P₂) sinaptosomas y restos de mielina; (VS) vesículas sinápticas; (EVS) extracto de vesículas sinápticas.

6.2. METODO DE SEIDLER: Se homogeneizaba el tejido en homogeneizador de vidrio con vástago de vidrio, en 4 volúmenes de sacarosa 0,32M en amortiguador Tris-sulfato 25 mM, pH 7,4. El homogeneizado se centrifugaba a 1000xg por 15 min, y luego el sobrenadante a 20.000xg por 20 min. El sedimento se descartaba y el sobrenadante se centrifugaba a 105.000xg por 30 min. El precipitado, rico en vesículas sinápticas, se resuspendía en amortiguador fosfato de potasio 130 mM pH, 7,0.

7.- PURIFICACION DE VESICULAS SINAPTICAS POR FILTRACION EN COLUMNA DE SEFAROSA-4B.

Como marcador de vesículas sinápticas se usó ^3H -noradrenalina, ^3H -NA, la que se incorporó a las vesículas incubando rebanadas de corteza cerebral en 1,2 ml de líquido cefaloraquídeo artificial (LCR) que contenía 5 μCi de ^3H -NA y 0,1 mM de pargilina, droga que inhibe la monoaminoxidasa (MAO; E.C. 1.4.3.4.; monoamine: oxygen oxidoreductase (Florkin y Stotz, 1964). Las rebanadas se obtuvieron manualmente de acuerdo al método de Mac Ilwain y Rodnight (1962). La incubación se realizó por 45 min a 37°C en la solución oxigenada y con agitación, condiciones en que se produce una entrada activa de noradrenalina a las vesículas.

Se prepararon vesículas sinápticas de corteza cerebral según Hata. Se homogeneizó el tejido junto a los cortes incubados previamente con ^3H -NA. La suspensión de vesículas sinápticas se pasó por una columna de Sefarosa 4B (13 x 1,1 cm) previamente calibrada con azul dextrano, para determinar el volumen de exclusión. La columna se equilibró con amortiguador Tris - HCl 10 mM, sacarosa 50 mM, pH 7,4 y se corrió a una velocidad de 0,25 ml/min colectándose fracciones de

0,6 ml. En los eluidos se determinó la absorbancia a 280 nm y la radiactividad, observándose que el máximo de radiactividad de ^3H -NA aparecía en las fracciones que presentan mayor concentración de proteínas. En los experimentos descritos posteriormente se suprimió la incubación con ^3H -NA y se consideró el máximo de absorbancia a 280 nm como indicador de las fracciones que contenía la mayor concentración de vesículas sinápticas.

8. EXTRACCION DEL CONTENIDO VESICULAR.

Considerando que los neurotransmisores descritos son en su mayoría moléculas simples, de bajo peso molecular o de naturaleza peptídica, la extracción del contenido vesicular se realizó de acuerdo a las técnicas clásicas descritas para la extracción de aminoácidos solubles y péptidos de bajo peso molecular.

La fracción de vesículas sinápticas se resuspendía en un volumen pequeño de agua destilada, se calentaba por 7 min en baño a 90°C y se centrifugaba a 105.000 x g por 20 min para separar el material insoluble. El sobrenadante de esta centrifugación constituía el extracto soluble de vesículas sinápticas (EVS), el cual se guardaba liofilizado a -20°C. El EVS liofilizado se resuspendía, al momento de usarlo, en amortiguador Tris-citrato 0,05 M, pH 7,1.

Se ensayó además la extracción con ácido tricloroacético al 4% a 4°C y con ácido acético 1 M a 80°C. Ninguno de estos procedimientos condujo a la obtención de mejores resultados en relación a la extracción por calentamiento a 90°C en medio acuoso.

9.- DETECCIÓN DE COMPUESTOS ENDOGENOS QUE SE UNEN AL RECEPTOR DE KAINATO.

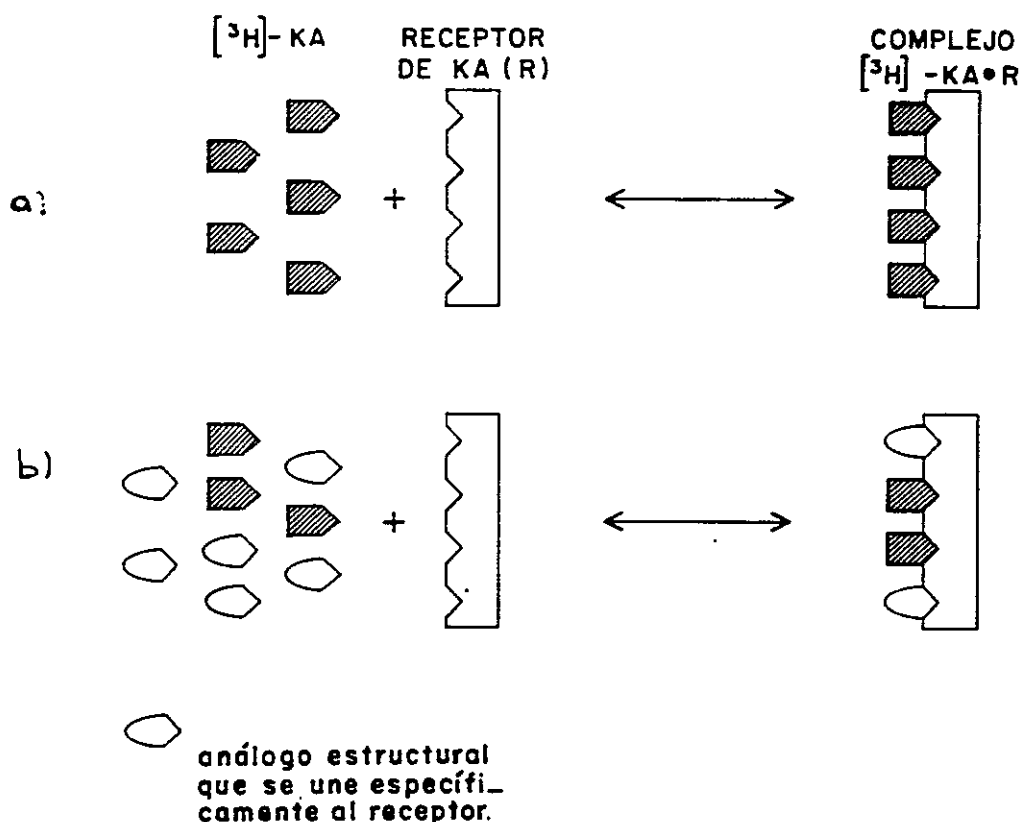


Figura 2. SISTEMA DE DETECCION. Se incubaba una cantidad fija de membranas sinápticas con una concentración dada de $^3\text{H-KA}$, determinándose la unión total del compuesto a las membranas. En un experimento similar se agregaba además 10^{-4} M de kainato frío. La unión específica se obtenía por diferencia entre la unión total y la radiactividad que quedaba unida a las membranas en presencia de kainato frío (Ver ensayo, 3.1). La detección de los compuestos endógenos que se unen al receptor de kainato se hacía incubando el extracto de vesículas sinápticas con la misma cantidad de membranas y de $^3\text{H-KA}$ usada en la determinación de la unión específica. La disminución de la unión específica de $^3\text{H-KA}$ a su receptor es función de la concentración de la sustancia presente en las vesículas sinápticas, que se une al receptor de kainato.

10. FILTRACION DEL EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS EN GEL DE SEPHADEX G-10. (Sefadex G-10).

El extracto EVS preparado por calentamiento a 90°C se fraccionó en una columna de Sefadex G-10 de 1,5 x 75 cm. El extracto de corteza cerebral se mezcló con ^3H -glutamato, el que sirvió como estándar interno para la localización de este aminoácido. La muestra se eluyó con agua bidestilada y filtrada, a un flujo constante de 1,2 ml/min, recogiendo fracciones de 1,3 ml. Se midió la radiactividad del ^3H -glutamato en alícuotas de cada fracción del eluido. De acuerdo a este valor y a fin de concentrar el posible ligando endógeno, se juntaron 2 o 3 fracciones, las que se liofilizaron y posteriormente se resuspendieron en agua al momento de efectuar el ensayo de unión al receptor de kainato. La columna se calibró previamente con azul dextrano para determinar su volumen de exclusión (V_0).

11. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE UN EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS

El EVS de corteza cerebral, mezclado con ^3H -glutamato, se cromatografió por tres horas en placas cromatográficas de celulosa, usando una mezcla de n-butanol: ácido acético: agua (65:10:25) como solvente móvil. La placa se secó a temperatura ambiente y la franja donde se fraccionó el extracto se cortó en trozos de 1 cm, los que se eluyeron con 2 ml de agua por 3 h. Los eluidos se filtraron y en una alícuota de cada uno de ellos se midió la migración la radiactividad del glutamato. En el resto del eluido se midió la unión de compuestos endógenos al receptor de kainato.

12. ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE DE UN EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS.

El EVS se fraccionaba por electroforesis de alto voltaje (HVE) en papel Whatman 3 MM aplicando un voltaje de 28 V/cm por tiempos variables y usando ^3H -glu y ^{14}C -asp como estándares internos. En algunos experimentos se usó ácido fórmico al 8%, pH 1,9, como solvente móvil y en otros amortiguador ácido acético-acetato de amonio 2 M, pH 2,9. Al completarse la electroforesis el papel se secaba a temperatura ambiente y se cortaba en trozos de 1-2 cm. Cada trozo se eluía por 3 horas en 2 ml de agua estéril. En una alícuota del eluido se medía la radiactividad y en el resto se estudiaba la unión de ligandos endógenos a las membranas. Se comprobó que el 90% de la radiactividad de los trozos de papel eluía en 2 horas, la extracción no aumentaba en tiempos más largos y no se vio diferencia si ella se efectuaba con agua o con HCl 0,1 N.

13. CAPTACION DE GLUTAMATO POR VESICULAS SINAPTICAS.

Se prepararon vesículas sinápticas de acuerdo al método de Hata, la preparación se filtró a través de una columna de Sefarosa 4B equilibrada con solución amortiguadora Tris- HCl 5 mM, sacarosa 0,32 M, pH 7,4, según se describió anteriormente. Esta preparación enriquecida en vesículas sinápticas se utilizó para el estudio de captación de acuerdo al procedimiento descrito por Naito y col. (1983).

La composición de la mezcla de incubación era 4 mM de MgSO_4 , 50 μM de glutamato, 1,7 μmol de ^{14}C -glutamato (500.000 cpm), 2 mM ATP y 0,27 mg de proteína en un volumen final de 1 ml de amortiguador Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, con sacarosa 0,32M.

Las vesículas suspendidas en el amortiguador Tris-HCl 5 mM pH 7,4, con sacarosa 0,32 M se preincubaban por 2 min a 30°C y luego se incubaban a diferentes tiempos en la mezcla A a la misma temperatura. La reacción se detenía por adición de KCl 0,15 M frío. El contenido de los tubos se filtraba a través de filtros Millipore HAWP (25 mm 0,45 μ m) humedecidos previamente en KCl. Los filtros se lavaban tres veces con 2,5 ml de KCl frío, se secaban bajo una lámpara infraroja y se medía la radiactividad retenida en ellos.

14. ENTRADA DE CALCIO A REBANADAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.

Las ratas se decapitaban, se extraía el cerebro y este se recibía en un medio fisiológico semejante al líquido cefaloraquídeo cuya composición era: NaCl 124 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 1,24 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1,3 mM, NaHCO_3 26 mM y glucosa 10 mM, pH 7,4. Este medio se equilibraba durante todo el experimento con una mezcla gaseosa de oxígeno y 5% de CO_2 .

Las rebanadas, obtenidas manualmente de acuerdo a la técnica de Mc Ilwain y Rodnight (1962) correspondientes a la parte más externa de la corteza y de un grosor aproximado de 350 μ m, se dividían en 6 trozos, cada uno de los cuales se transfería a un matraz Erlenmeyer que contenía 0,7 ml de LCR.

Las rebanadas se preincubaban por 30 min a 37°C en un baño Dubnoff con agitación permanente de 90 ciclos por minuto. La reacción se iniciaba agregando una mezcla de 0,37 μ Ci de ^3H -inulina, 500.000 cpm de ^{45}Ca y la droga en estudio en 0,3 ml de LCR. Al finalizar la incubación se cogían las rebanadas con una espátula de acero inoxidable, se escurría el medio de incubación y se colocaban en un tubo con

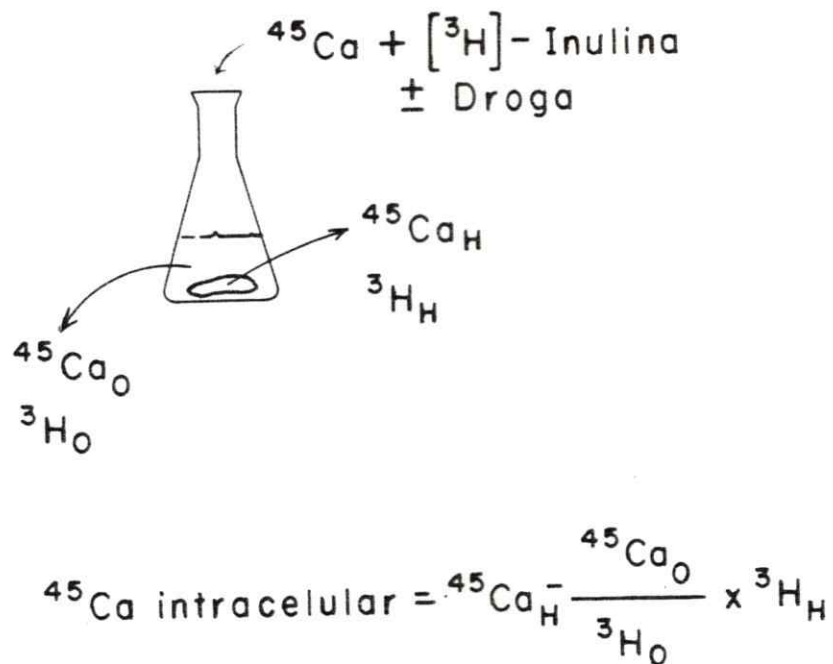


Figura 3. ENTRADA DE CALCIO A REBANADAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.
 $^{45}\text{Ca}_0$ y $^3\text{H}_0$ = radiactividad en el medio de incubación. $^{45}\text{Ca}_H$ y $^3\text{H}_H$ =
 radiactividad en el homogeneizado.

1 ml de agua bidestilada. Se homogeneizaba el tejido en un homogeneizador de vidrio y en una alícuota de 0,5 ml se determinaba la cantidad de proteína y la radiactividad de ^{45}Ca y ^3H por separado. Se medía también la radiactividad de ^{45}Ca y ^3H en 0,05 ml del medio de incubación. La captación de calcio se determinaba por diferencia entre el ^{45}Ca total de la rebanada y el ^{45}Ca presente en el espacio extracelular dado por la inulina, que no penetra a la célula.

14.1. CALCULO: Ya que tanto el calcio como la inulina entran libremente al espacio extracelular, la razón entre ^{45}Ca y ^3H en éste sería la misma que existe en el medio de incubación. La diferencia entre la razón $^{45}\text{Ca}:^3\text{H}$ en el homogeneizado y en el medio correspondería al calcio que entró a la célula (Fig 3).

15. HIDROLISIS ENZIMÁTICA Y ANALISIS DEL CONTENIDO DE AMINOACIDOS LIBRES EN N-ACETILASPARTILGLUTAMATO.

Las membranas sinápticas de corteza cerebral, se suspendieron en Tris-citrato 20 mM, pH 7,1 y se incubaron por 20 min a 4°C en presencia y ausencia de ácido N-acetilaspartilglutámico. La reacción se detuvo con TCA al 50%. Las proteínas precipitadas se centrifugaban a 4°C por 20 min a 4000xg descartándose el precipitado. El sobrenadante se extrajo con eter etílico, se burbujeó con N_2 y se liofilizó. Este residuo seco se disolvió en 0,5 ml de citrato de sodio 0,2 N pH. 3,28, inyectándose 0,25 ml de solución en un analizador de aminoácidos Beckmann 120 C de columna larga. Se usó una mezcla de 0,1 μmoles de treonina y 0,1 μmoles de serina como estándares de corrida.

16. EFECTO DE N-ACETILASPARTILGLUTAMATO Y GLUTAMATO EN CEREBRO DE GATO in vivo.

El estudio se realizó infundiendo las sustancias a través de una cánula implantada estereotáxicamente en el cerebro del gato y detectando su efecto mediante registro electroencefalográfico.

Se utilizaron dos gatos adultos a los cuales se controlaron las reacciones pupilares, auditivas y conductuales, antes y después de la implantación de la cánula. La operación se efectuó 7 días antes de iniciar los experimentos, anestesiando los animales con Nembutal (20 mg/kg de peso). La cánula de acero inoxidable, 20 gauge y los electrodos se colocaron en forma permanente en las estructuras deseadas de acuerdo a las coordenadas del Atlas de Jasper y Ajmone-Marsan (1954), confirmándose su ubicación mediante análisis histológico después de sacrificar al animal .

En uno de los gatos la cánula se implantó en el hipocampo dorsal derecho y los electrodos se colocaron en hipocampo derecho, pulvinar derecho y corteza parietal derecha. En el otro gato la cánula se colocó en el nucleo pulvinar derecho del tálamo y los electrodos en pulvinar izquierdo, hipocampo derecho, núcleo caudado derecho y corteza derecha.

Las infusiones y registros se realizaron con el animal sin anestesiarse y desplazándose libremente por su jaula. Las drogas se disolvieron el mismo día del experimento, en un medio N cuya composición era: NaCl 140 mM; KCl 4 mM; MgCl₂ 1 mM; Ca Cl₂ 1 mM; HEPES 10 mM y glucosa 10 mM, pH 7,4.

La infusión de 1 μ l de medio N, que después de 10 min no produjo alteraciones pupilares, conductuales ni del EEG se consideró como control electroencefalográfico. Esta infusión de medio N se realizaba al comienzo de cada experimento. En cada sesión se aplicaban solamente tres inyecciones de 1 μ l a cada gato para evitar el aumento de la presión local de líquido sobre el tejido.

La solución de glutamato se neutralizaba con NaOH por lo que en los experimentos en que se infundía este aminoácido el control se realizaba agregando a la solución N una cantidad de iones sodio equivalente a la usada en la neutralización. Este Na⁺ adicional no alteraba el EEG con respecto a la solución N sin sodio

17. DETERMINACION DE PROTEINAS.

La concentración de proteínas se determinaba por el método de Lowry y col. (1951), usando seroalbúmina bovina como estándar.

RESULTADOS

BUSQUEDA DE UNA SUSTANCIA ENDOGENA CONTENIDA EN VESICULAS SINAPTICAS QUE SE UNE A RECEPTORES DE KAINATO Y N-METIL-D-ASPARTATO

Al comenzar esta tesis se desconocía el significado biológico de los diferentes receptores de glutamato y la naturaleza de la sustancia endógena que se une a ellos. Se postuló que si esta sustancia endógena tenía una función neurotransmisora debía estar presente en el terminal presináptico y concentrada en vesículas como lo está la mayor parte de los transmisores clásicos. Los estudios se realizaron a partir de extractos de vesículas sinápticas provenientes de diferentes áreas del SNC.

Como sistema de detección se usó la unión de ácido ^3H -kaínico a membranas sinápticas. La estructura del ácido kaínico comprende el esqueleto del ácido glutámico incorporado a un anillo rígido de cinco átomos de carbono. Este compuesto se une selectivamente a membranas sinápticas, es desplazado por glutamato y su unión es saturable y de alta afinidad.

La ventaja de usar ^3H -Kainato en vez de ^3H -glutamato reside en que el kainato no es recaptado por el terminal sináptico y no es metabolizado por la célula.

Basándose en la misma premisa, se trató de identificar la sustancia endógena que se une fisiológicamente al receptor que une

N-metil-D-aspartato, usando como sistema de detección la unión de ^3H -NMDA a membranas sinápticas.

A. EFECTO DE GLUTAMATO, KAINATO Y ASPARTATO SOBRE LA UNIÓN DE ^3H -KAINATO A SU RECEPTOR DE MEMBRANA.

A fin de determinar la especificidad del receptor de kainato se estudió la competencia de ^3H -KA con kainato, glutamato y aspartato no radiactivos (fríos). Estos dos últimos compuestos poseen propiedades excitadoras y están relacionados estructuralmente con el kainato.

Los resultados se muestran en la Fig 4, en que la disminución de la unión se expresa como porcentaje de un control. El 100% de este control corresponde a la unión específica de ^3H -kainato, determinada como la diferencia entre la unión total y la obtenida cuando la incubación se realizaba en presencia de 10^{-4}M de kainato frío. En general la unión específica representaba un 25-50 % de la unión total. Al centrifugar las membranas, para separar el kainato libre del que se ha unido, es probable que quede una cantidad considerable de agua y ^3H -KA atrapados en el sedimento, lo que podría explicar la magnitud de la unión inespecífica.

Puede observarse que la unión de kainato en el equilibrio es saturable y que el número de cuentas unidas al tejido es menor en presencia de la sustancia sin marca que en ausencia de ella. La diferencia representa la cantidad de isótopo desplazado al competir con el kainato no radiactivo e indica un número limitado de sitios de unión para kainato. La inhibición máxima de la unión de ^3H -KA se produjo a

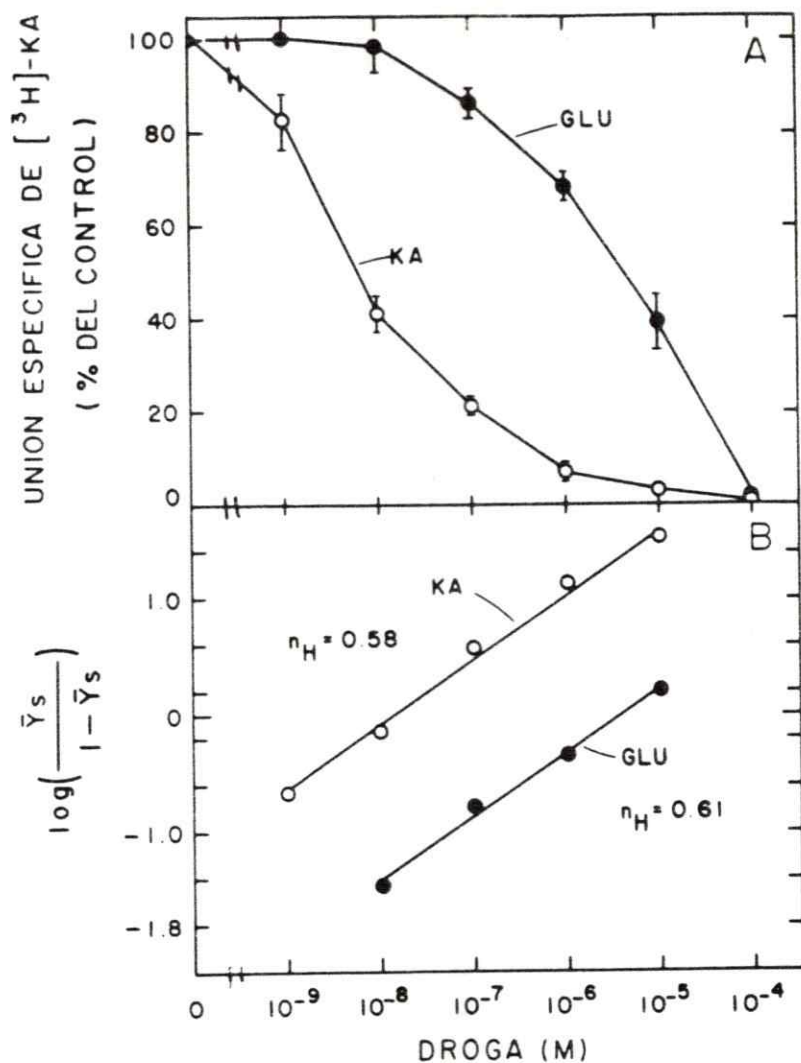


Figura 4. A. UNION DE ACIDO ³H-KAINICO A MEMBRANAS SINAPTICAS, COMPETENCIA CON KAINATO Y GLUTAMATO FRIO. Las membranas sinápticas se incubaron con ³H-KA 40 nM (2.6 Ci/mmol) por 20 min a 4°C. a) en ausencia de KA o glu b) en presencia de las concentraciones de KA o glu que se indican en el gráfico. Las condiciones del ensayo se describen en Material y Métodos. Las determinaciones se hicieron por triplicado y cada punto representa el promedio de los valores obtenidos. La unión específica del ³H -KA se expresa como el % de un control en que el 100% corresponde a la unión total menos la unión inespecífica (ver métodos). B. GRAFICO DE HILL. Al número máximo de receptores para kainato presentes en la membrana se le da el valor 1. \bar{y}_s es la fracción de saturación del receptor con la droga (concentración de la droga unida al receptor/concentración total de receptores). $1-\bar{y}_s$ corresponde a la fracción de receptores libres presentes en la membrana (Riveros y Orrego, 1982).

una concentración 10^{-4} M de kainato, con 10^{-5} M se obtuvo un 96% de desplazamiento en relación al control.

Los resultados obtenidos en el ensayo efectuado en presencia de concentraciones crecientes de glutamato muestran que la afinidad de este aminoácido por el receptor es menor que la de kainato. El aspartato no produjo disminución de la unión de $^3\text{H-KA}$ a ninguna de las concentraciones ensayadas, por lo que los valores obtenidos no se incluyen en el gráfico.

El cálculo, mediante análisis gráfico, de las concentraciones de compuesto necesarias para inhibir el 50% de la unión específica de $^3\text{H-KA}$ a membranas (IC_{50}), dio valores de 4 nM para kainato y 4 μM para glutamato, es decir el kainato es 1000 veces más potente que el glutamato para desplazar la unión del $^3\text{H-kainato}$ de su receptor.

Al llevar los datos a un gráfico de Hill, se obtuvo un número de Hill (nH) de 0,58 para el KA y de 0,61 para el glutamato, lo que podría indicar una cooperatividad negativa entre los sitios de unión o la presencia de sitios de diferente afinidad por el ligando, lo que estaría de acuerdo con los datos aparecidos en la literatura en los últimos años (ref. en Foster y Fagg, 1984).

B. ESTUDIO DE LA UNIÓN DE ^3H -N-METIL-D,L-ASPARTATO A SU RECEPTOR DE MEMBRANA.

El receptor del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) se ha caracterizado electrofisiológicamente y mediante técnicas autoradiográficas se ha establecido su distribución en distintas áreas del SNC. Sin embargo hasta el momento de realizar este estudio aún no se había descrito la unión específica de este compuesto a membranas sinápticas.

Cuando se usaron membranas de corteza cerebral no se detectó unión específica de $^3\text{H-NMA}$ en ninguna de las condiciones de ensayo que se indican en material y métodos. En cambio al incubar el $^3\text{H-NMA}$ con membranas de médula espinal preparadas de acuerdo al mismo método, se obtuvo un desplazamiento de la unión del compuesto marcado en presencia de 10^{-5} y 10^{-3} M de NMA frío. El desplazamiento con ambas concentraciones fue de 26 pmoles de NMA por mg de proteína. La unión específica correspondía a un 10% de la unión total del ligando radiactivo.

C. INHIBICION DE LA UNION DE $^3\text{H-KA}$ A SU RECEPTOR POR UNA SUSTANCIA CONTENIDA EN VESICULAS SINAPTICAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.

Las vesículas sinápticas se preparaban de acuerdo al método de Hata y col. (1976) y su contenido se extraía por calentamiento a 90°C . Al preincubar las membranas en presencia de cantidades crecientes de EVS, entre 10 y $50\ \mu\text{l}$, en las condiciones señaladas para el estudio de la unión de $^3\text{H-KA}$, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Fig 5. Se puede apreciar que mientras mayor era la cantidad de EVS utilizada menor era la unión específica del $^3\text{H-kainato}$

D. SEPARACION Y CARACTERIZACION DEL COMPONENTE ENDOGENO QUE SE UNE AL RECEPTOR DE ACIDO KAINICO.

FILTRACION POR COLUMNA DE SEFADEX G-10. El EVS de corteza cerebral se filtró a través de una columna de Sefadex G-10. Al analizar las fracciones que eluyen de la columna se obtuvieron los resultados que se muestran en la Fig. 6A. El mayor desplazamiento de la unión de

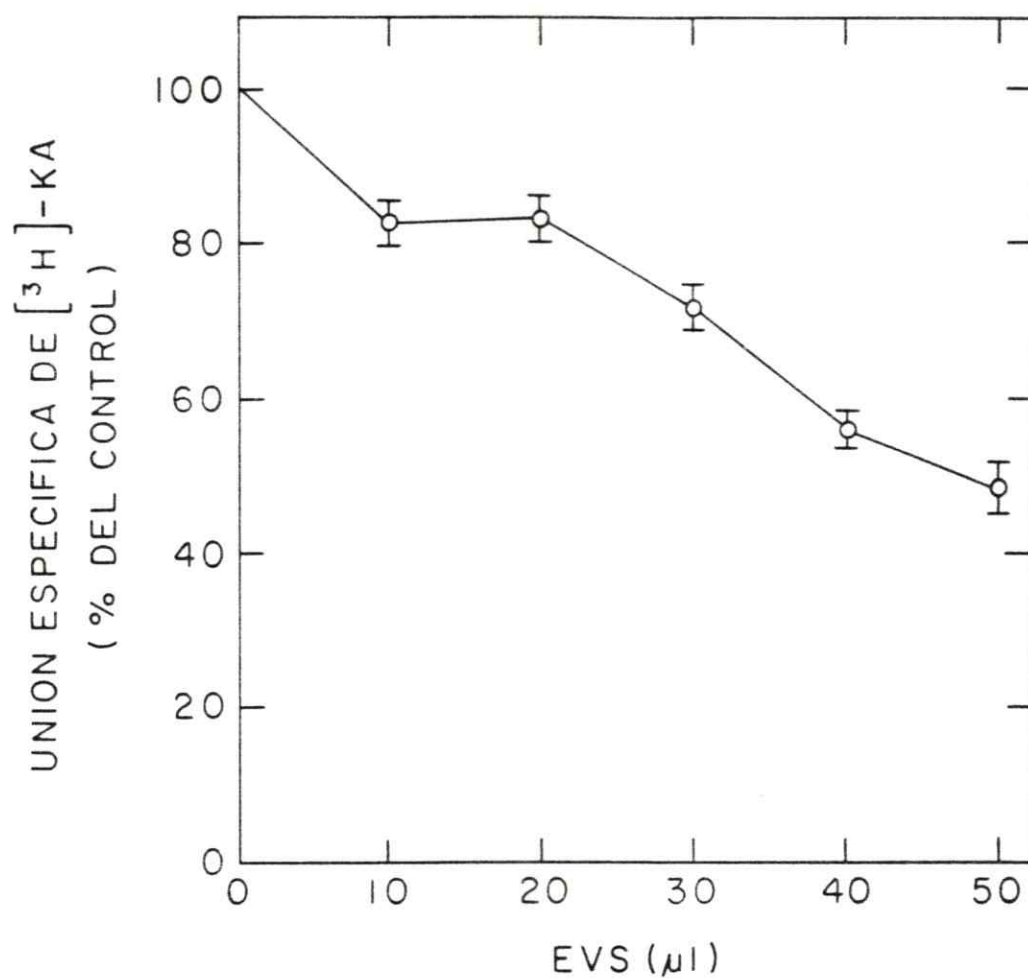


Figura 5. ACIDO ^3H -KAINICO UNIDO A MEMBRANAS EN PRESENCIA DE UN EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS (EVS). El ensayo se efectuó en las condiciones que se indican en la Fig.4 usando cantidades crecientes de EVS en vez de los aminoácidos fríos. El EVS se preparó como se indica en Material y Métodos. Diez μl de EVS contenían 65 μg de proteínas y provenían de 4,2 mg de tejido húmedo de corteza cerebral. Las determinaciones se hicieron por triplicado y los puntos corresponden a valores promedio \pm el error estándar de la media (Riveros y Orrego, 1982).

^3H -KA se consiguió con las fracciones en que aparecen componentes de bajo peso molecular, en un pico coincidente con la aparición de ^3H -glu. Puede observarse un segundo pico que contiene una sustancia que interfiere con la unión de ^3H -KA, esta sustancia tendría un peso molecular menor que el glutamato y podría corresponder a sales presentes en la preparación las que se ha descrito que alteran la unión de kainato (Foster y Fagg, 1984).

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA: El EVS proveniente de corteza cerebral se cromatografió en hojas de celulosa. Luego de correr la muestra, se secó la placa a temperatura ambiente. La "franja" correspondiente al fraccionamiento del extracto se cortó en trozos de 1 cm, los que se eluyeron con agua. En una alícuota de los eluidos se determinó la radiactividad y en el resto se midió la unión de ligandos endógenos para el receptor de kainato.

Los resultados se muestran en la Fig. 6B, de ellos puede deducirse la presencia de un ligando que produce desplazamiento del ^3H -KA unido al receptor cuya migración coincide con la del ácido glutámico usado como marcador.

ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE. a) EN ACIDO FORMICO AL 8%, pH 1,9. El extracto de vesículas sinápticas obtenido por calentamiento a 90°C se sometió a una electroforesis de alto voltaje en papel usando como solución de corrida ácido fórmico al 8%, pH 1,9. La electroforesis se corrió por 30 min con un voltaje de 28 V/cm. La muestra migró desde el polo positivo al negativo. Al finalizar la corrida se secó el papel y se cortó en trozos, los que se eluyeron con agua estéril. En una alícuota de cada fracción se determinó la radiactividad

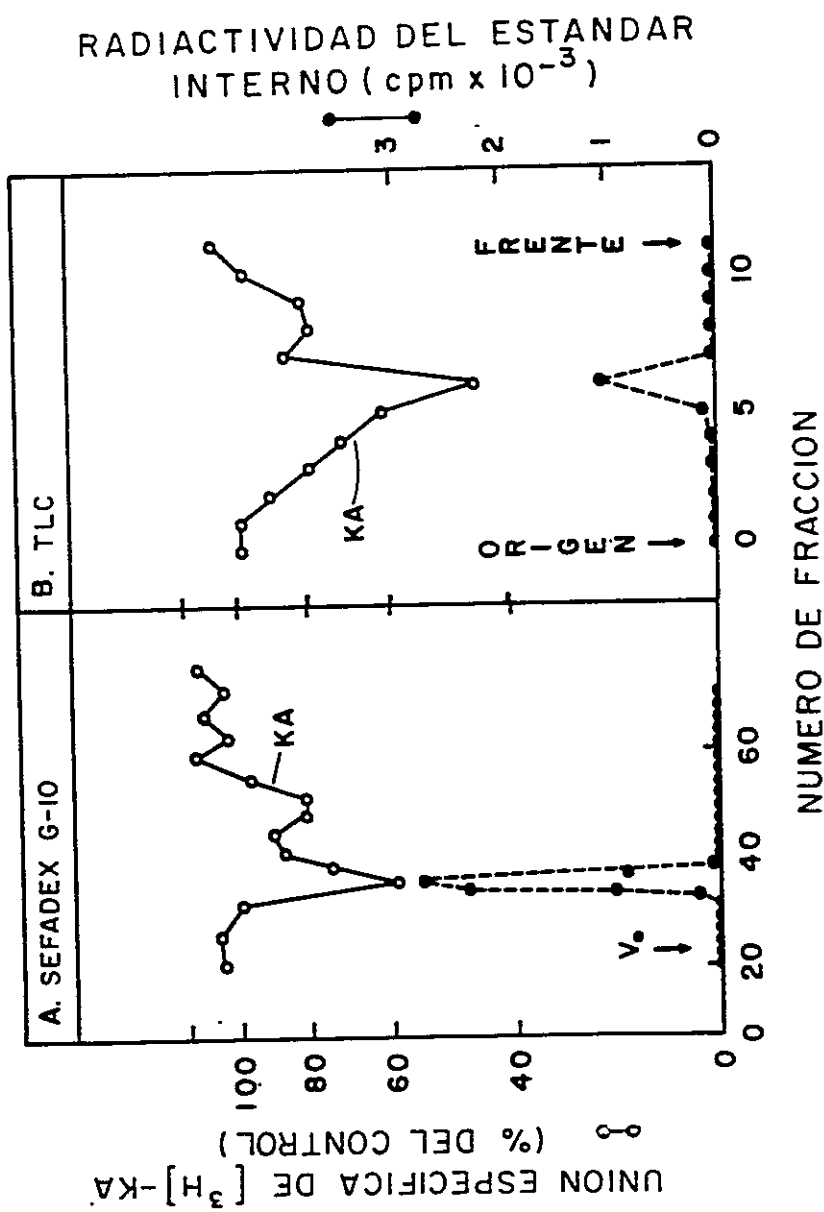


Figura 6. FRACCIONAMIENTO DE SUSTANCIAS ENDOGENAS QUE SE UNEN AL RECEPTOR DE KAINATO CONTENIDAS EN UN EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS (EVS) DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. Leyenda en la página siguiente (Riveros y Orrego, 1982).

Figura 6. FRACCIONAMIENTO DE SUSTANCIAS ENDOGENAS QUE SE UNEN AL RECEPTOR DE KAINATO CONTENIDAS EN UN EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS (EVS) DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. El EVS se obtuvo como se indica en Material y Métodos. Previo al fraccionamiento, el EVS se mezcló con una cantidad de ^3H -glu no detectable mediante el radioensayo, pero que permitió una localización precisa del aminoácido. A. Filtración de EVS proveniente de 1,4 g de tejido húmedo, a través de una columna de Sefadex G-10 de 1,5 x 75 cm. Se eluyó con agua a una velocidad de 1,2 ml/min y se recogieron fracciones de 1,3 ml cada una. Se midió la radiactividad de cada fracción para detectar la salida del glutamato y se mezclaron 2-3 fracciones a fin de concentrar la posible sustancia endógena activa. Las fracciones mezcladas se liofilizaron y guardaron en frío hasta el momento de efectuar el ensayo de desplazamiento de la unión de ^3H -KA a membranas.

B. Cromatografía en placas de celulosa (TLC) de un extracto proveniente de 1 g de tejido húmedo. La muestra se corrió por 3 h sobre placas de celulosa usando una mezcla de n-butanol: ácido acético y agua (65:10:25 v/v) como solvente de corrida. Las placas se secaron y cortaron en trozos de 1 cm los que se eluyeron con 2 ml de agua estéril durante 3 h. Los eluidos se filtraron y en el sobrenadante se midió la radiactividad del glutamato y el efecto de ellos sobre la unión de ^3H -KA a membranas. La presencia de sustancias endógenas que se unen al receptor de kainato se muestra como un desplazamiento de la unión específica del ^3H -KA, expresado como un porcentaje del control (o), cada punto corresponde a mediciones efectuadas por triplicado. (●), migración del estándar de ^3H -glu.

del ^3H -glu y del ^{14}C -asp y en el resto del eluido la capacidad para desplazar la unión de kainato.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 7A. Puede observarse que hay un solo pico de material endógeno capaz de desplazar al kainato, el máximo desplazamiento se logró con el eluido correspondiente a las fracciones donde aparecía el máximo de radiactividad. En estas condiciones no se consiguió una buena separación entre glutamato y aspartato.

b) EN SOLUCION DE ACIDO ACETICO Y ACETATO 2M, pH 2,9. El EVS se aplicó en el papel junto al ^{14}C -asp y el ^3H -glu. La muestra se corrió por 90 minutos aplicando un voltaje de 28 V/cm. Se procedió de la misma forma que para la electroforesis en ácido fórmico. Los resultados se muestran en la Fig. 7B, señalándose el origen y la polaridad de la corrida. Puede observarse que en estas condiciones experimentales se obtiene una clara separación de aspartato y glutamato. Las fracciones que producen mayor desplazamiento de la unión de kainato coinciden con las que aparece el máximo de radiactividad de ^3H -glu.

Los resultados obtenidos por fraccionamiento del extracto de vesículas sinápticas de corteza cerebral mediante tres procedimientos basados en diferentes principios fisicoquímicos, sugieren que el único componente endógeno presente en la fracción vesicular y que compite con el kainato en su unión a membranas, es el glutamato.

Al preparar extractos de vesículas sinápticas de cuerpo estriado, hipotálamo y cerebelo y someterlos a electroforesis de alto voltaje usando amortiguador acetato en las condiciones descritas, se obtuvieron resultados similares a los del fraccionamiento del extracto de corteza cerebral (Fig 8).

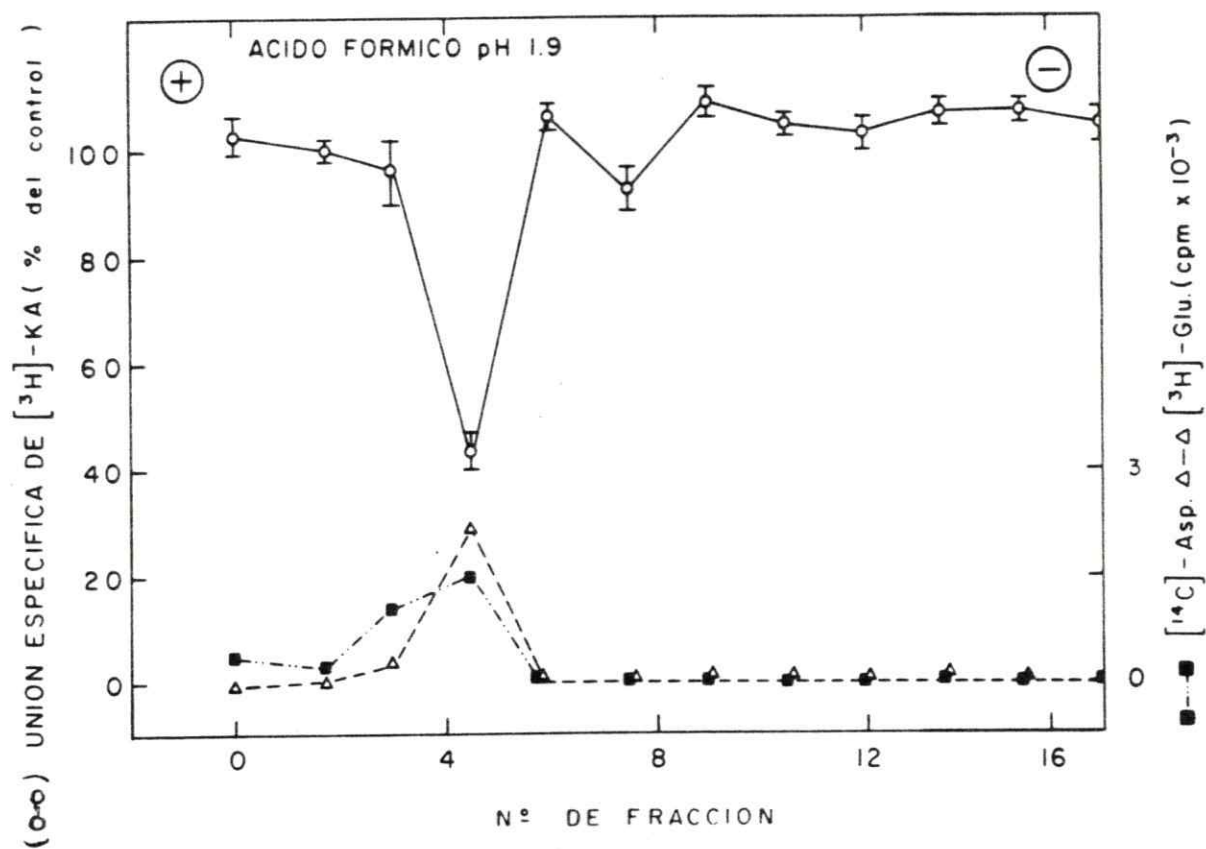


Figura 7A. ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE DE UN EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. Leyenda en la página sub-siguiente.

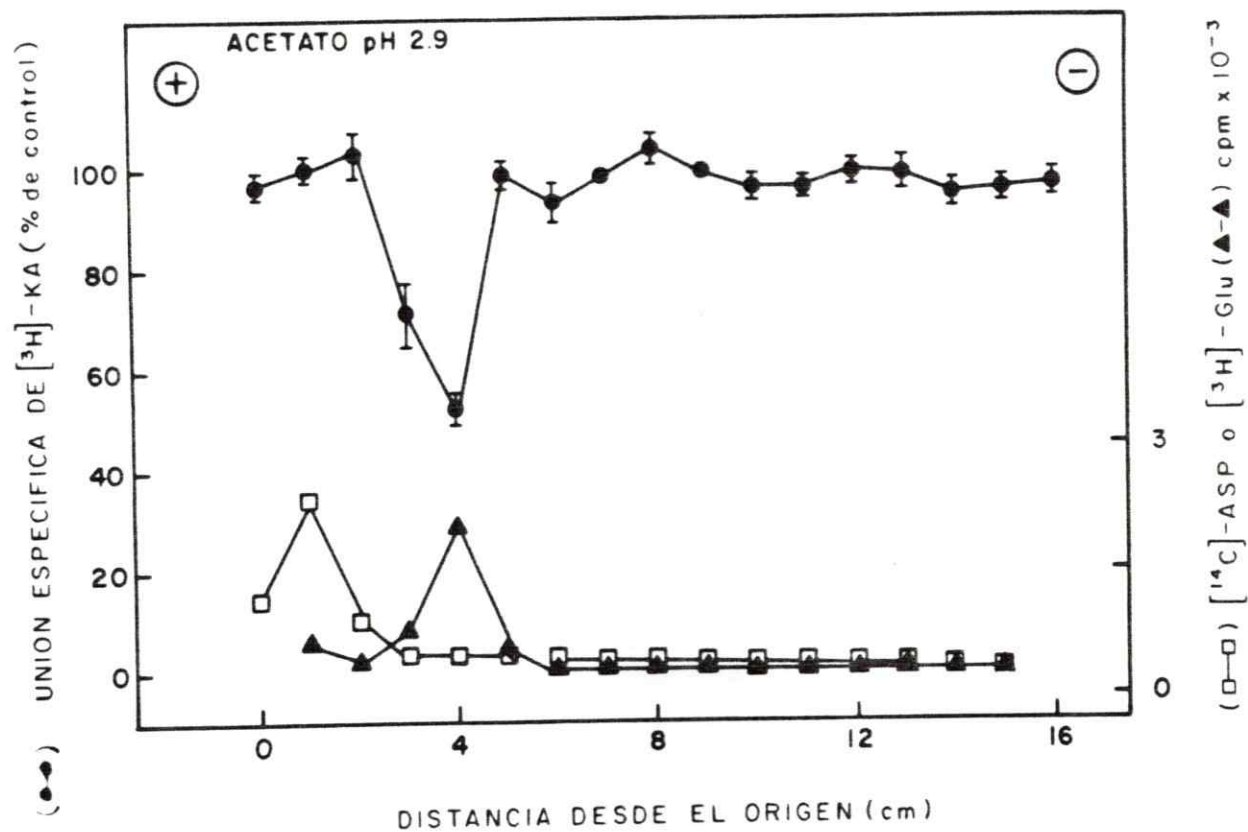


Figura 7B. ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE DE UN EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. Leyenda en la página siguiente (Riveros y Orrego, 1982).

Figura 7. ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE DE UN EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS (EVS) DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. El EVS (150 μ l provenientes de 0,6 g de tejido húmedo) se fraccionó por electroforesis de alto voltaje (28 V/cm) en papel Whatman 3MM.

A. usando como solución de corrida ácido fórmico al 8%, pH 1,9 por 30 min (o-o) unión específica de $^3\text{H-KA}$.

B. usando como solución de corrida acetato 2M pH 2,9 durante 90 min (o-o) unión específica de $^3\text{H-KA}$.

En ambos casos se colocó $^{14}\text{C-asp}$ y $^3\text{H-glu}$ como marcadores internos de la migración de estos aminoácidos. El origen corresponde al 0 y la polaridad de corrida fue la que se indica. Al término de la electroforesis se secó el papel a temperatura ambiente y se cortó en trozos de 1-2 cm. Cada trozo se eluyó por 2 h en 2 ml de agua estéril. Se midió la radiactividad del eluido y se ensayó su efecto sobre la unión de $^3\text{H-KA}$. La presencia de sustancias endógenas que se unen al receptor de kainato se muestra como una inhibición de la unión de $^3\text{H-KA}$ y se expresa como % del control.

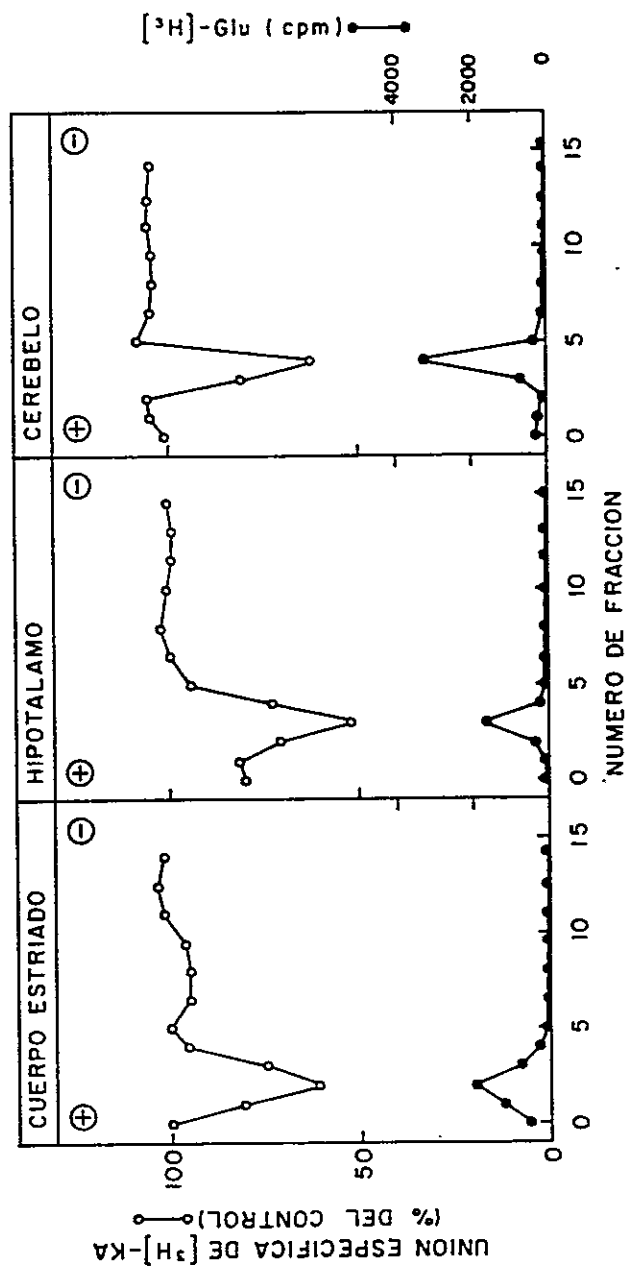


Figura 8. ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE DE UN EXTRACTO DE VESICULAS SINAPTICAS DE CUERPO ESTRIADO, HIPOTALAMO Y CEREBELO. Se fraccionaron por separado extractos EVS de cuerpo estriado, hipotálamo y cerebello (provenientes de 0,4, 0,8 y 1,2 g de tejido húmedo respectivamente). Las condiciones experimentales se indican en la Figura 4. La electroforesis se corrió por 90 min usándose amortiguador acetato 2M pH 2,9, para la corrida y ^3H -glu como marcador interno (●). (○) Unión específica de ^3H -KA expresado como % del control.

En todos los casos las fracciones que produjeron el mayor desplazamiento de la unión de kainato coincidieron con aquellas en que aparece el máximo de radiactividad de ^3H -glutamato.

El contenido de glutamato en las vesículas provenientes de las regiones estudiadas se estimó a partir de la curva de desplazamiento del ^3H -KA por glutamato que se muestra en la Figura 4. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 2.

El extracto de vesículas de hipocampo no produjo desplazamiento de la unión de ^3H -KA a su receptor. Tampoco se observó efecto al ensayar un extracto de vesículas de médula espinal. El que no se hayan encontrado sustancias endógenas que se unan al receptor de KA en estas áreas puede deberse a que la concentración del aminoácido en ellas no sea lo suficientemente alta como para ser detectada por el método usado, considerando que la afinidad del receptor es mucho menor para glutamato que para kainato.

E. PURIFICACION PARCIAL DE VESICULAS SINAPTICAS Y DETERMINACION DE GLUTAMATO EN ELLAS.

La ruptura de los sinaptosomas, mediante tratamiento con solución hipoosmótica para liberar las vesículas sinápticas, puede originar un resellamiento de trozos de la membrana plasmática y generar vesículas de tamaño variable que pueden atrapar sustancias presentes en el citosol. Muchas de estas membranas reselladas tienen un tamaño semejante al de las vesículas sinápticas lo que hace difícil la separación de ambas. En la búsqueda de ligandos endógenos para el receptor de kainato contenidos en vesículas sinápticas, la presencia de

T A B L A 2

FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS DE VESICULAS SINAPTICAS POR ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE

tejido	peso tejido húmedo (g)	desplazamiento de la unión de kainato (% control)	contenido de glutamato nmoles/g de tejido húmedo.
CORTEZA CEREBRAL	0,6	45,9	54,7
CUERPO ESTRIADO	0,4	38,3	40,0
HIPOTALAMO	0,8	48,3	50,0
CEREBELO	1,2	37,0	10,0

* Los extractos se obtuvieron a partir de vesículas sinápticas preparadas de acuerdo al método de Hata, por calentamiento a 90°C por 7 min.

En todos los casos se usó una solución de ácido acético-acetato 2 M, pH 2,9, como amortiguador de corrida y las condiciones de ensayo fueron las que se indican en las Fig. 7 y 8.

El contenido de glutamato se estimó a partir de la curva de desplazamiento de la unión de ³H-KA que se muestra en la figura 4.

vesículas de membrana resellada que pudieran atrapar glutamato citoplasmático u otra sustancia que se una a este receptor constituye una importante fuente de error.

Dado el alto contenido de glutamato en las células nerviosas, pareció importante separar tanto las vesículas sinápticas como las vesículas formadas por membrana resellada, del glutamato citoplasmático libre.

La preparación de vesículas sinápticas de corteza cerebral se filtró a través de Sefarosa 4B, cuyo límite de exclusión es de $3-4 \times 10^6$ Dalton. Las vesículas sinápticas no debieran ser retenidas en la columna, lo mismo que las vesículas de membrana resellada de un tamaño mayor que el límite de exclusión del gel, en cambio si lo serían las partículas de menor tamaño y el glutamato citoplasmático.

Las vesículas de corteza cerebral a las que se agregó ^3H -glutamato se hicieron pasar por una columna de Sefarosa 4B. En todas las fracciones se midió la radiactividad de ^3H -glu y la absorbancia a 280 nm. Las fracciones ricas en vesículas sinápticas, que eran las que tenían mayor absorbancia y que coincidían con aquellas en que salía la ^3H -noradrenalina usada como marcador (no se muestra), se calentaban y luego se centrifugaban a alta velocidad. Los sobrenadantes de las fracciones se agrupaban de acuerdo a los valores de radiactividad y absorbancia y se liofilizaban a fin de concentrar el componente activo endógeno.

VESICULAS PREPARADAS POR EL METODO DE HATA. Se aplicó a la columna una suspensión de vesículas de corteza cerebral, a la cual se se agregó previamente el ^3H -glu para detectar la aparición de

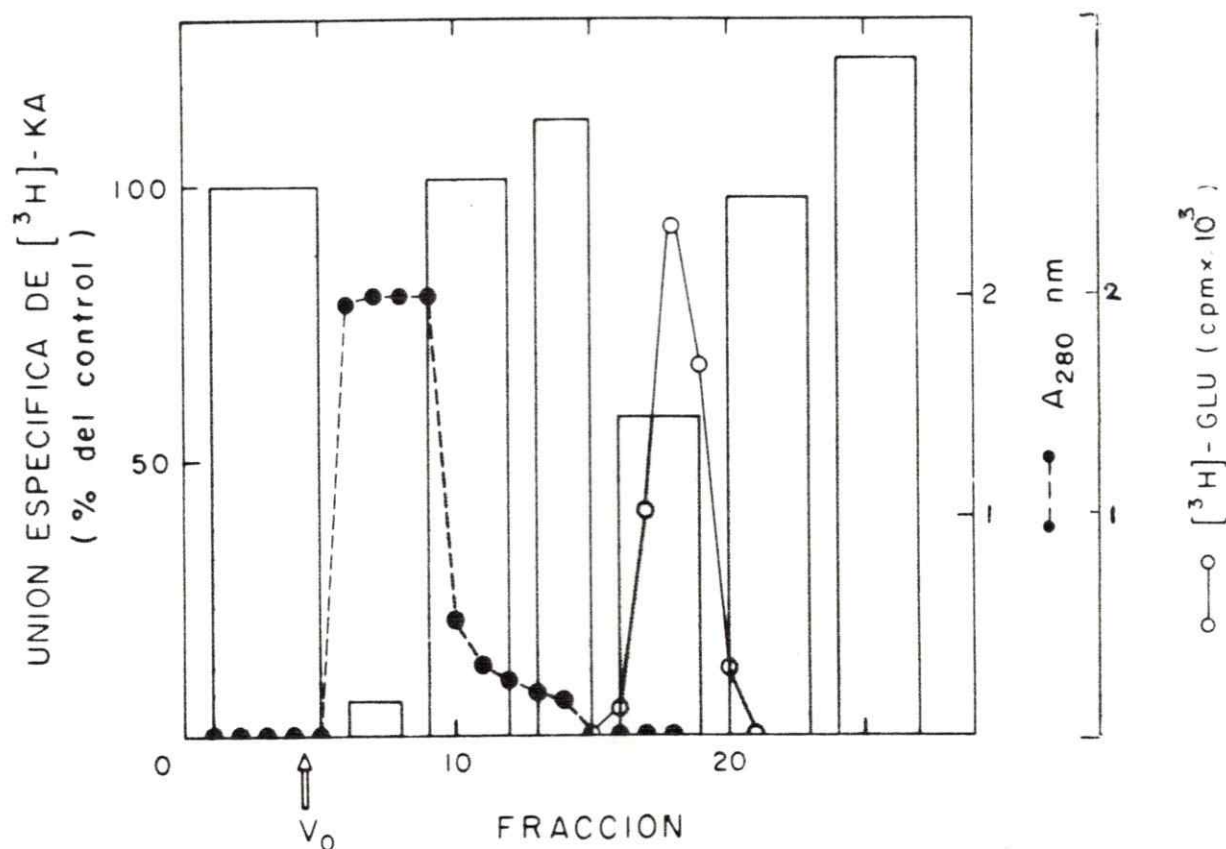


Figura 9. FILTRACION DE VESICULAS SINAPTICAS POR SEFAROSA 4B. Las vesículas sinápticas (800 μ l provenientes de 1,6 g de tejido) preparadas por el método de Hata y mezcladas con 3 H-glu se filtraron por una columna de Sefarosa 4B de 13 x 1,1 cm. La columna se eluyó con amortiguador Tris-HCl 10mM pH 7,4 y sacarosa 50 mM con un flujo de 0,25 ml/min, colectándose fracciones de 0,6 ml. El volumen de exclusión se determinó con azul dextrano. En todas las fracciones se midió la radiactividad del 3 H-glu (○) y la absorbancia a 280 nm (●), cuyo máximo corresponde a la fracción en que salen las vesículas. De acuerdo a estos valores se agruparon 3-5 fracciones, como lo indica el ancho de las barras, las que se calentaron por 7 min a 90°C y una vez frías se centrifugaron a 100.000 x g por 30 min. Los sobrenadantes se liofilizaron y se suspendieron en un pequeño volumen de amortiguador Tris-citrato 0,05 M pH 7,4, para efectuar el ensayo de unión de kainato. El glutamato endógeno se detectaba por su capacidad para inhibir la unión de 3 H-KA a su receptor de membrana (Riveros y col., 1986).

glutamato libre en los eluidos. Los resultados se muestran en la Fig 9, en la que puede observarse que las vesículas sinápticas aparecen concentradas en las primeras fracciones del eluido, como se desprende de los valores de absorbancia a 280 nm. El glutamato libre, en cambio, es retardado en la columna. La unión específica de kainato disminuye en un 93% en presencia de los eluidos que contienen las vesículas y en un 43% en presencia de aquellos en que aparece el glutamato libre.

Estos valores referidos a la curva de desplazamiento de kainato por glutamato (Fig 4) equivaldrían a 350 nmoles de glutamato en las primeras fracciones y a 15,3 nmoles en las que aparece el aminoácido libre, valores expresados por g de tejido húmedo. En esta preparación había 23 veces más glutamato contenido en vesículas que glutamato libre.

VESICULAS PREPARADAS POR EL METODO DE SEIDLER. Esta preparación de vesículas sinápticas de corteza cerebral se fraccionó en una columna de Sefarosa 4B. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig 10, en la que puede observarse que no hay desplazamiento significativo de la unión de KA por los sobrenadantes provenientes de las fracciones que contienen las vesículas. Se observó una inhibición del ligamen por las fracciones que eluían tardíamente de la columna y que contienen glutamato libre. Estas fracciones producen un 83% de inhibición de la unión de kainato, lo que correspondería a 330 nmoles de glutamato/g de tejido húmedo.

Este método, que es más rápido que el de Hata, incluye una homogeneización, en homogeneizador de vidrio de lumen estrecho, la que

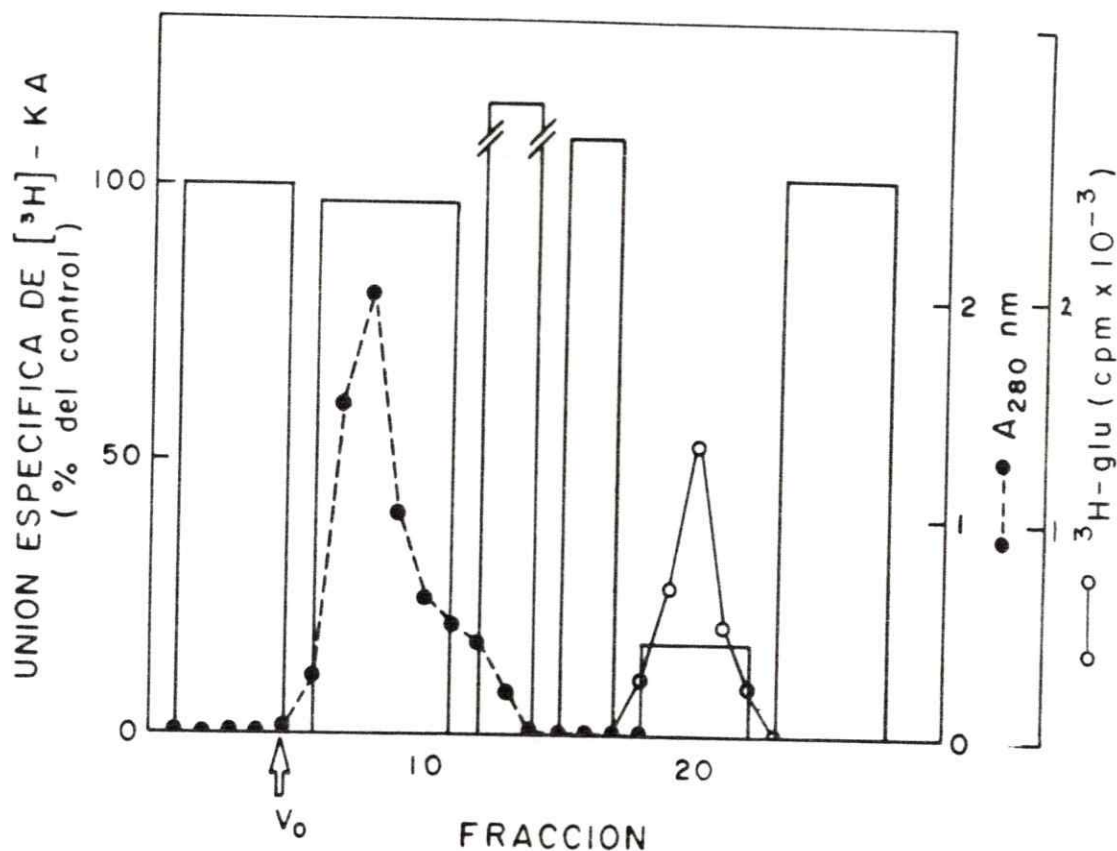


Figura 10. FILTRACION DE VESICULAS SINAPTICAS POR SEFAROSA 4B. Las vesículas sinápticas (800 μ l provenientes de 1,5 g de corteza cerebral) preparadas por el método de Seidler y mezcladas con ^3H -glu, se fraccionaron en una columna de Sefarosa 4B de 13 x 1,1 cm. Se usó amortiguador fosfato de potasio 130mM pH 7,4, para equilibrar la columna y para correr la muestra. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se señalan en la figura anterior.

podría provocar ruptura de las vesículas sinápticas y así explicar el que en la fracción vesicular no se detecte ningún componente que desplace la unión de kainato.

Para cuantificar el grado de contaminación del contenido de las vesículas sinápticas con componentes citoplasmáticos incluidos en membranas reselladas, se prepararon vesículas sinápticas por el método de Hata, agregando 2 μCi de ^3H -glu (3×10^6 cpm) en el medio de homogeneización. Este glutamato marcado, presente durante toda la preparación, debiera ser atrapado por las vesículas formadas por resellamiento de las membranas del mismo modo que el glutamato libre presente en el tejido. Las vesículas sinápticas obtenidas se fraccionaron en la columna de Sefarosa 4B, en las condiciones señaladas anteriormente para la purificación parcial de vesículas sinápticas. Se midió la absorbancia a 280 nm, la concentración de proteínas y la radiactividad de cada fracción del eluido de la columna.

De acuerdo al contenido de proteínas, la recuperación de las vesículas sinápticas fue prácticamente total. Se observó que la fracción particulada contenía un 0,1% del aminoácido tritiado agregado al medio de homogeneización. Esto indicaría que hay una cierta contaminación de la preparación con sustancias solubles citoplasmáticas atrapadas en vesículas de membrana resellada. Si el contenido de glutamato en corteza es de alrededor de 10 nmoles por gramo de tejido húmedo (Benjamin y Quastel, 1972), en la fracción particulada se tendría un 3,5% del total. Ya que el 0,1% del ^3H -glutamato agregado aparece en la fracción particulada y que toda la radiactividad proviene del

glutamato atrapado en membranas reselladas, un 2,86% del aminoácido en la fracción correspondería a contaminación citoplasmática.

F. CAPTACION DE GLUTAMATO POR VESICULAS SINAPTICAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.

En general se sabe muy poco de la captación de aminoácidos por vesículas sinápticas. Recientemente Naito y Ueda (1983) han establecido que el proceso difiere del que existe en los sinaptosomas en cuanto a su dependencia de Na^+ , ATP y temperatura.

Ya que en las vesículas sinápticas sólo detectamos glutamato como ligando para el receptor de kainato, parecía interesante establecer si la presencia del aminoácido correspondía a un problema de difusión o era el resultado de un transporte activo que podría reafirmar su rol como neurotransmisor.

Se investigó la funcionalidad de las vesículas sinápticas en relación a su capacidad para captar glutamato. Las vesículas preparadas de acuerdo al método de Hata, se purificaron parcialmente por filtración en columna de Sefarosa 4B y se incubaron a diferentes tiempos en presencia de ATP y a 30°C , obteniéndose los valores que se muestran en la Fig 11.

La captación de glutamato fue dependiente de ATP y temperatura. Tanto la incubación de las vesículas a 4°C a diferentes tiempos, como los ensayos hechos en ausencia de ATP no se tradujeron en incorporación de glutamato.

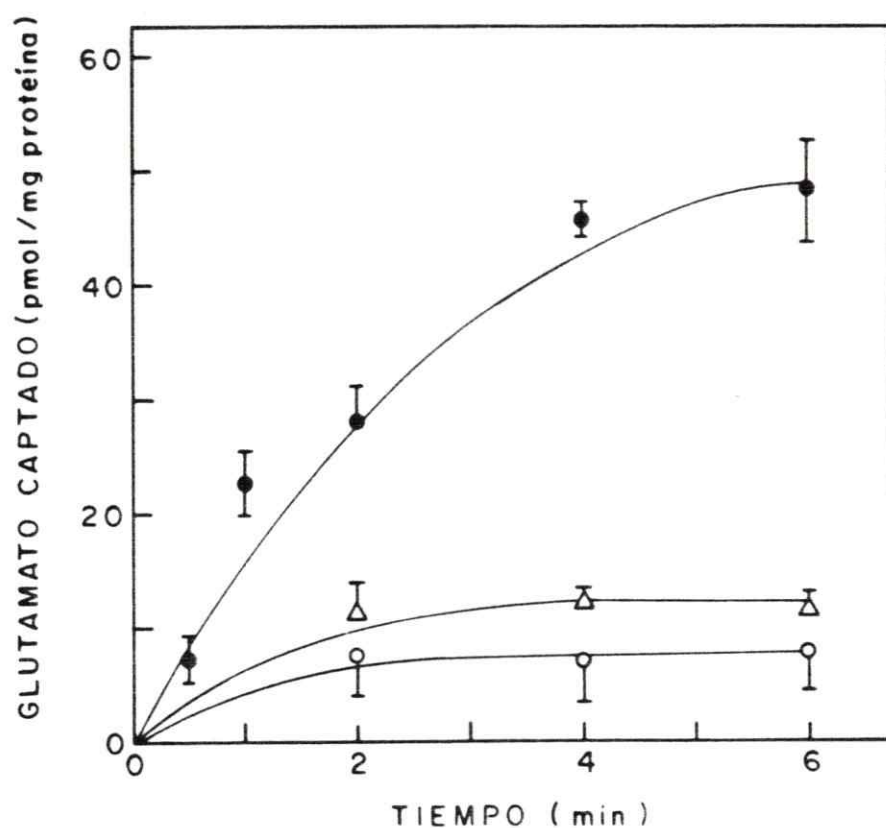


Figura 11. CAPTACION DE GLUTAMATO POR VESICULAS SINAPTICAS. Las vesículas sinápticas (0,27 mg de proteínas) preparadas por el método de Hata y purificadas parcialmente por filtración en columna de Sefarosa 4B, se incubaron por los tiempos que se indican en (●) medio completo con ATP, a 30°C; (Δ) medio completo sin ATP, a 30°C; (○) medio completo, a 4°C. Los experimentos se realizaron de acuerdo a lo señalado en los métodos. Los valores corresponden a pmoles de glutamato incorporados por mg de proteína.

ENTRADA DE CALCIO A CORTES DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA, in vitro.

Se ha descrito que la estimulación eléctrica de la fimbria del hipocampo de rata produce una despolarización de los somas de las células piramidales, acompañada de un aumento de la actividad (concentración efectiva) del potasio extracelular y una disminución de la actividad del calcio extracelular. La variación máxima de actividad de los iones coincide con el máximo de despolarización neuronal (Heinemann y Pumain, 1980).

Ya que la estimulación química de neuronas de cerebro de rata por glutamato aumenta la entrada de calcio a la célula (Harvey y Mc Ilwain, 1968; Cooke y Robinson, 1971) y con el fin de establecer si todas las sustancias excitadoras producen este fenómeno, se montó un sistema de bioensayo para medir la acción de compuestos excitadores sobre la entrada de calcio al espacio intracelular de rebanadas de corteza cerebral de rata.

Se analizó el efecto de aminoácidos excitadores tales como kainato, N-metil-D,L-aspartato, glutamato, homocisteato e ibotenato, sobre la entrada de calcio a la célula. La estructura de estos aminoácidos excitadores se muestra al comienzo de la tesis.

A. EFECTO DE KAINATO SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO. Los cortes de corteza se incubaron por tiempos variables en un medio A que contenía ^3H -inulina, ^{45}Ca y una concentración 5 mM de kainato. Al finalizar la incubación el tejido se homogeneizó en agua. En una alícuota del homogeneizado se midió la radiactividad de cada isótopo y en otra la concentración de proteínas. Se determinó también la radiactividad en

el medio de incubación y con estos valores se calculó la entrada de calcio a la célula de acuerdo a lo señalado en Métodos y en la Fig 3.

En la Fig 12 puede observarse que el kainato 5 mM produjo un gran aumento de la velocidad de entrada de ^{45}Ca en relación a un control incubado en las mismas condiciones experimentales, pero en ausencia de la droga. Este aumento de la velocidad inicial fue de aproximadamente tres veces a los 5 min. La entrada de calcio alcanzó un equilibrio a los 10 min tanto en presencia de kainato como en el control obteniéndose un nivel de calcio dos veces mayor en presencia de la droga.

Cuando las rebanadas se preincubaron por 30 min a 37°C antes de agregar la droga y el ^{45}Ca , se obtuvieron resultados semejantes a los descritos pero se redujo sustancialmente la captación basal de calcio.

B. EFECTO DE GLUTAMATO Y HOMOCISTEATO. En la Fig 13 se muestra el incremento en la velocidad inicial de entrada de calcio a los cortes al incubarlos a diferentes tiempos con cada sustancia por separado, en las condiciones señaladas para el estudio del efecto de kainato. En estos casos se observa un efecto menor que el de kainato a tiempos cortos. A los 5 min la velocidad inicial es aproximadamente dos veces mayor que el control. En los tiempos en que se efectuaron los ensayos no se alcanzó el equilibrio. A los 20 min de incubación el nivel de calcio es cercano al que se obtuvo incubando con kainato.

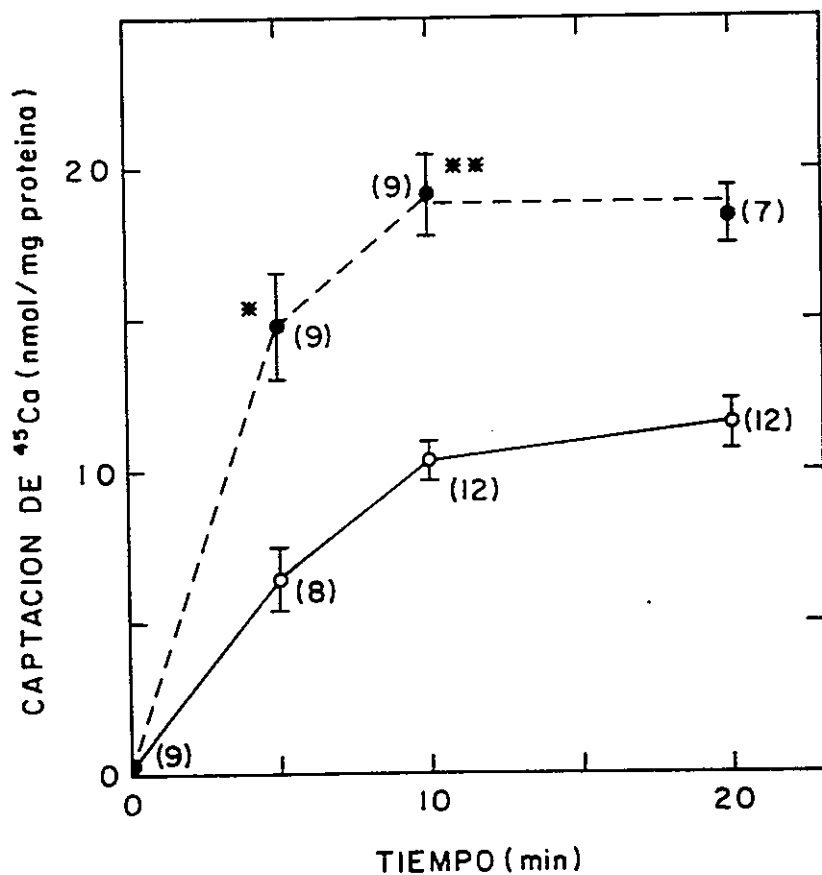


Figura 12. EFECTO DE KAINATO SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO A CORTES DE CORTEZA CEREBRAL. Los experimentos se realizaron como se describe en métodos, en ausencia (o) y en presencia de kainato 5 mM (●). El experimento sin kainato representa la entrada de calcio en condiciones basales. El número de experimentos realizados se indica entre parentesis (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$, en relación al control sin kainato).

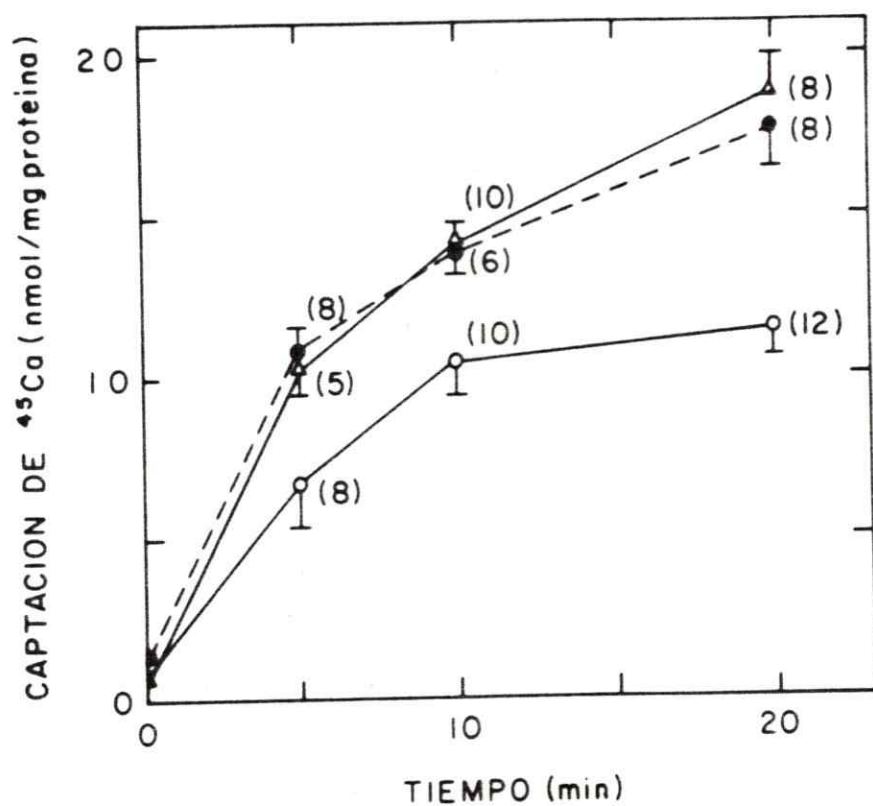


Figura 13. EFECTO DE GLUTAMATO Y HOMOCISTEATO SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO. Los experimentos se realizaron como se describe en métodos usando una solución 5mM de glutamato (\bullet) o de homocisteato (Δ). (\circ) control en ausencia de aminoácido.

C. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AMINOACIDOS EXCITADORES SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO.

Se ha observado que un gran número de derivados y análogos de glutamato y aspartato, que poseen propiedades excitadoras sobre neuronas centrales de vertebrados, producen destrucción celular. El mecanismo mediante el cual ocurre esta destrucción no se conoce y se pensó que tal vez el aumento transitorio en el flujo de Ca^{2+} pudiese estar relacionado con este fenómeno de toxicidad.

En la tabla 3 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de N-metil-D,L-aspartato, kainato, L-glutamato, D,L-homocisteato e ibotenato sobre la captación de ^{45}Ca en 5 min. En cada serie de experimentos se hicieron los controles correspondientes incubando los cortes en una solución con ^{45}Ca y ^3H - inulina, en ausencia de aminoácido. La entrada de ^{45}Ca en estas condiciones, alrededor de 10 nmoles/mg de proteína, se consideró como un 100% y todos los valores obtenidos por incubación de los cortes en presencia de los compuestos en estudio se expresaron como porcentaje de este control.

Todas las sustancias ensayadas, aminoácidos que tienen efecto excitador del sistema nervioso central, inducen aumentos significativos en la captación de ^{45}Ca por el tejido.

El compuesto más potente fue el ibotenato que indujo un aumento significativo en la entrada de calcio a una concentración de 6,3 μM . El NMA, aunque menos activo que el ibotenato, produjo estimulación a una concentración 10 veces menor que la necesaria para observar el efecto de los otros compuestos ensayados. Ambos compuestos actúan sobre los receptores de glutamato que unen NMDA. Se analizó el efecto

T A B L A 3

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE AMINOACIDOS ACIDOS Y ANALOGOS
SOBRE LA CAPTACION DE ^{45}Ca .

Sustancia	Concentración	Captación de calcio (% de control)	N	P
N-Metil-DL-Aspartato	16,50 μM	96,4 \pm 7,9	4	N.S.
	50,00 μM	136,6 \pm 12,2	4	a.
	100,00 μM	185,9 \pm 4,3	4	b.
	330,00 μM	179,1 \pm 4,8	3	b.
	1,00 mM	156,0 \pm 4,0	3	b.
Kainato	10,00 μM	92,6 \pm 10,1	10	N.S.
	0,62 mM	149,9 \pm 10,1	13	b.
	1,25 mM	163,5 \pm 10,9	11	b.
	2,50 mM	163,2 \pm 6,7	11	b.
	5,00 mM	158,7 \pm 10,6	9	b.
L-Glutamato	0,62 mM	163,1 \pm 12,0	6	b.
	1,25 mM	179,2 \pm 13,0	6	b.
	5,00 mM	189,0 \pm 11,1	6	b.
D,L-Homocisteato	0,62 mM	131,2 \pm 9,0	6	c.
	1,25 mM	160,9 \pm 3,5	5	b.
	2,50 mM	154,7 \pm 5,0	6	b.
Ibotenato	6,30 μM	135,6 \pm 4,3	3	c.
	19,00 μM	152,6 \pm 9,6	3	a.
	56,90 μM	195,9 \pm 8,6	3	b.
	170,60 μM	181,3 \pm 4,5	3	b.
N-Acetil-L-Aspartato	1,25 mM	76,7 \pm 4,6	3	b.
	2,50 mM	81,1 \pm 3,7	3	b.
	5,00 mM	75,9 \pm 4,8	3	b.
α -Metil-D,L-Aspartato	1,25 mM	93,7 \pm 6,7	4	N.S.
	5,00 mM	114,0 \pm 12,1	3	N.S.

Los cortes se incubaron con diferentes concentraciones de aminoácidos por 5 min en las condiciones descritas en métodos. La entrada de Ca a los cortes incubados en ausencia de estos compuestos, alrededor de 10 nmoles/mg de proteína en 5 min, se consideró como un 100%. Los valores obtenidos al incubarse en presencia de los aminoácidos se expresan como porcentaje de este control. (a: $p < 0.01$, b: $p < 0.001$, c: $p < 0.02$; NS: no significativo; N: número de experimentos) (Berdichesvsky y col., 1983).

de dos compuestos derivados de aspartato, que no poseen acción excitadora ni neurotóxica, sobre la entrada de calcio a las rebanadas de corteza cerebral. En la Tabla 3 se muestra la captación de calcio luego de una incubación de los cortes por 5 min, con diferentes concentraciones de N-acetilaspártato y α -metil -D,L-aspártato. Puede observarse que estos compuestos no producen estimulación de la entrada de calcio. El N-acetilaspártato, compuesto que está presente en altas concentraciones en el cerebro produjo, por el contrario, una inhibición de la entrada de calcio de alrededor de un 20% .

De estos resultados se desprende que el efecto excitador del glutamato y algunos análogos neurotóxicos se acompaña de un aumento del influjo de calcio a la célula, el que es proporcional a la concentración de droga. Los compuestos que no poseen acción excitadora ni neurotóxica no incrementan la entrada de calcio. Por lo tanto, el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular podría constituir el efecto unificador de la acción tóxica de los compuestos excitadores.

D. CARACTERIZACION DE LA ENTRADA DE CALCIO ASOCIADA A LA ACTIVACION DE RECEPTORES PARA AMINOACIDOS EXCITADORES.

El aumento de la velocidad inicial de entrada de calcio producida por NMA, glutamato y sus análogos podría ser el equivalente bioquímico de la activación de canales de calcio observada en estudios electrofisiológicos. Para caracterizar esta entrada de calcio se estudió su sensibilidad frente a diferentes inhibidores de canales iónicos. No existen inhibidores muy específicos de canales de calcio, pero en membranas excitables estos canales son bloqueados por Cd^{2+} y

Co^{2+} e inhibidos por dihidropiridinas como la nifedipina y otras (Akerman y Nicholls, 1983; Reuter, 1983).

La caracterización se orientó fundamentalmente hacia el mecanismo de entrada de ^{45}Ca estimulado por NMA ya que como se señaló anteriormente, estos receptores serían los que se activan preferentemente en la preparación de corteza usada en estos estudios.

a. EFECTO DE IONES CADMIO Y COBALTO. Se ensayó el efecto de Co^{2+} y Cd^{2+} por separado, sobre la estimulación de la entrada de calcio producida por NMA. Los cortes se incubaron a diferentes tiempos en el medio de incubación con ^{45}Ca e ^3H -inulina en ausencia y presencia de NMA para tener el control y la estimulación de la entrada de Ca en las nuevas condiciones experimentales y luego en presencia de Co^{2+} ó Cd^{2+} con y sin NMA. Los resultados se muestran en la Fig. 14. La incubación de los cortes en presencia de Cd^{2+} redujo la estimulación de la entrada de calcio inducida por NMA a un nivel cercano al de la entrada basal. Cuando el ensayo se hizo en ausencia de NMA se observó que el Cd^{2+} por si solo no afectaba la entrada de calcio (no se muestra). Algo similar ocurrió en los experimentos realizados en presencia de Co^{2+} , este ión no afecta la entrada basal de calcio pero bloquea completamente la estimulación por NMA.

b. EFECTO DE NIFEDIPINA. Los resultados que se muestran en la Fig. 15 corresponden a la captación de calcio estimulada por NMA en presencia y ausencia de nifedipina (NF). Las curvas obtenidas al incubar los cortes en presencia de NMA y de NMA más NF no son estadísticamente diferentes. La NF por si sola indujo un gran incremento de la

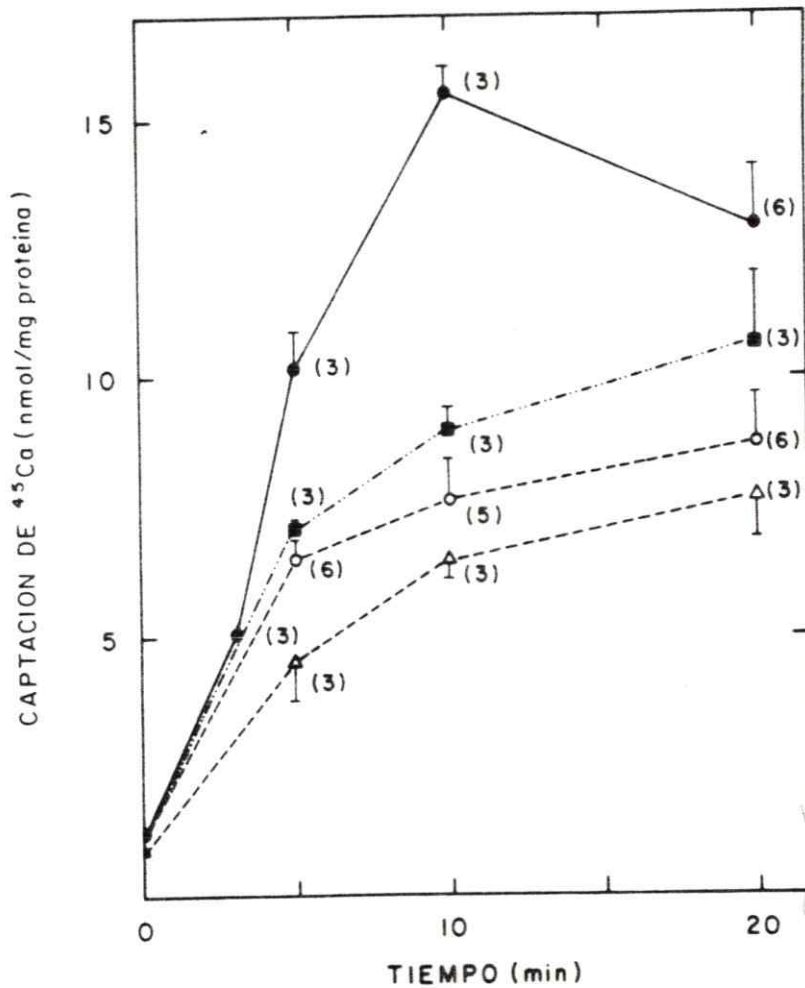


Figura 14. EFECTO DE LOS IONES COBALTO Y CADMIO SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO ESTIMULADA POR NMA. Los cortes de corteza cerebral de rata se incubaron por tiempos variables en un medio cuya composición era NaCl 142 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1,3 mM, CaCl₂ 1 mM en Tris-HCl 20 mM pH 7,4, glucosa 10 mM, saturado con O₂ puro. Se usaron concentraciones de CoCl₂ y CdCl₂ 3 mM y NMA 150 μM. El procedimiento experimental se indica en métodos. (●) NMA; (■) NMA + Cd²⁺; (△) NMA + Co²⁺; (○) control en ausencia de NMA, Co²⁺ y Cd²⁺. El Co²⁺ y Cd²⁺ por si solos no afectan la entrada basal de calcio (Riveros y Orrego, 1986).

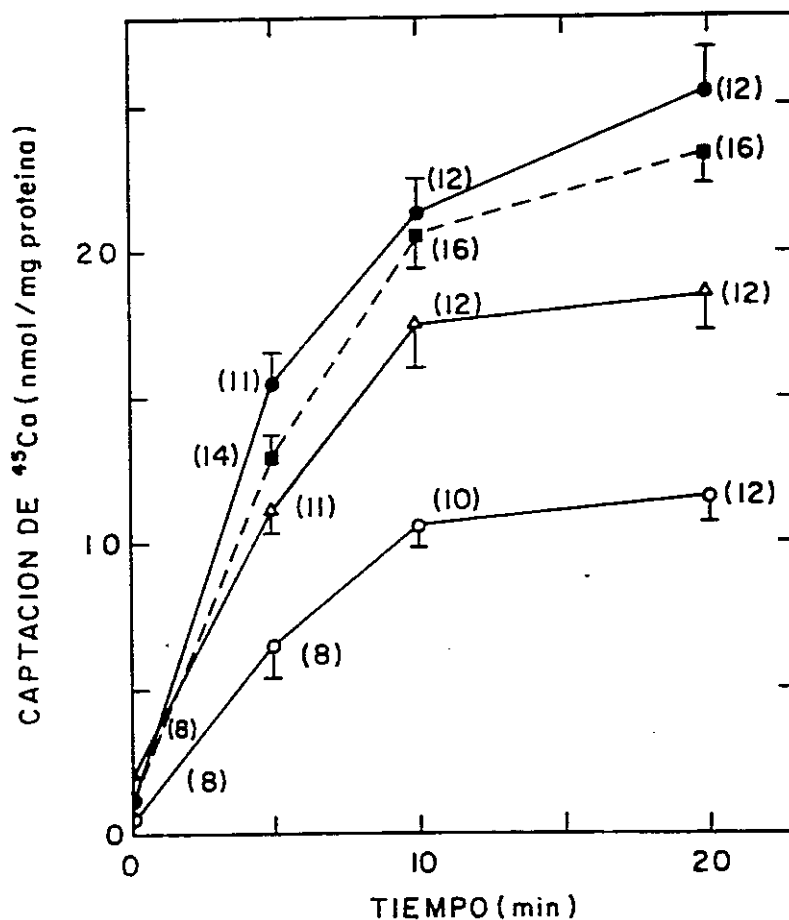


Figura 15. EFECTO DE NMA Y NIFEDIPINA SOBRE EL CURSO TEMPORAL DE LA CAPTACION DE CALCIO. Los cortes se preincubaron en LCR artificial por 30 min y luego se agregaron ^{45}Ca , ^3H -inulina, NMA $150\mu\text{M}$ y/o la NF $1\mu\text{M}$ (tiempo 0). Los experimentos con NF se hicieron en pieza oscura y con los matraces cubiertos con papel de aluminio. (○) control en ausencia de NF y/o NMA. (△) en presencia de NF $1\mu\text{M}$. (●) en presencia de NMA $150\mu\text{M}$. (■) en presencia de NMA $150\mu\text{M}$ y NF $1\mu\text{M}$. El número de experimentos se indica entre parentesis (Riveros y Orrego, 1986).

velocidad inicial de entrada de calcio que resultó ser 2 veces mayor que el control a los 5 min de incubación.

Estos resultados sugieren que la nifedipina no sería capaz de reducir la estimulación de la entrada de Ca^{2+} inducida por NMDA en corteza, a diferencia del efecto que se ha descrito que tiene sobre los canales de calcio en músculo liso y corazón (Miller y Freedman, 1984).

EFEECTO DE TETRODOTOXINA. Se ha descrito que el KA, el glutamato y el NMA producen aumento de la entrada de Na^+ a la célula. En este sistema de rebanadas de corteza se ha observado que al incubar los cortes en presencia de ^{22}Na , ^{14}C -inulina y kainato se induce un gran aumento en la velocidad inicial de entrada de ^{22}Na a la célula, en relación a la entrada del ión en ausencia de KA (Berdichevsky y col., 1983).

Se trató de establecer una relación entre la entrada de Ca^{2+} y la despolarización producida fundamentalmente por entrada de Na^+ , ya que se ha descrito que en neuronas de gato, in vivo, la despolarización producida por NMA parece estar asociada a la entrada de sodio por un canal dependiente de voltaje e insensible a tetrodotoxina (Heinemann y Pumain, 1981).

Se investigó el efecto de TTX, bloqueador de canales de sodio, sobre la entrada de calcio estimulada por NMA. En la Fig 16 se muestran las curvas obtenidas en las condiciones experimentales descritas. Puede observarse que la estimulación de la entrada de calcio por NMA no fue modificada por TTX luego de 5 min de incubación,

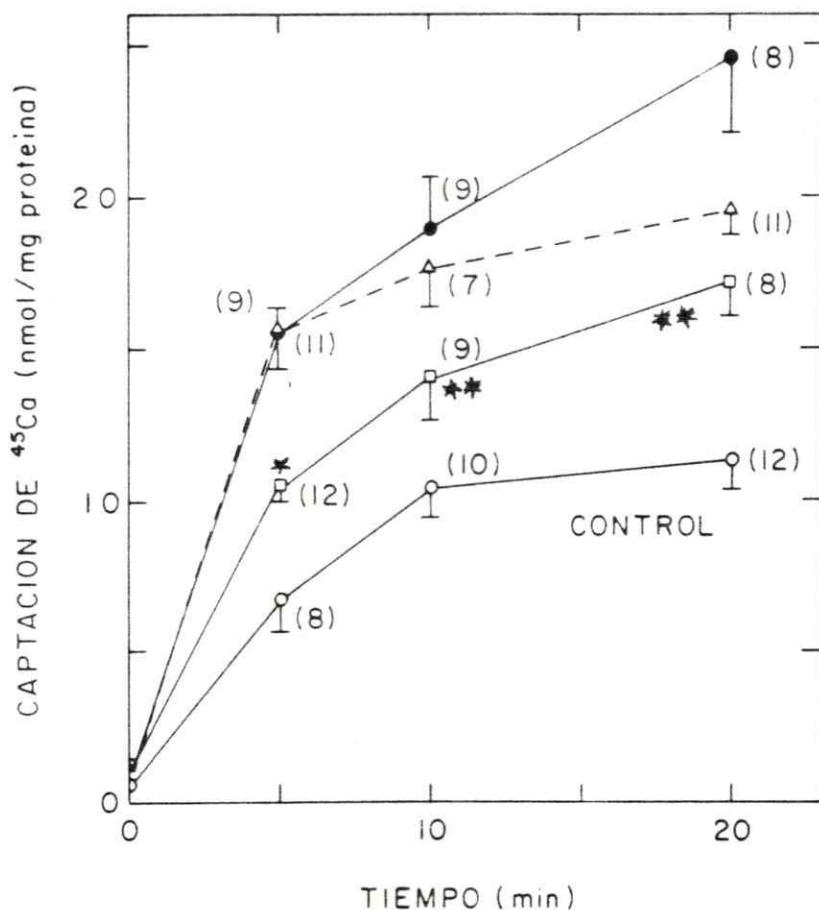


Figura 16. EFECTO DE TETRODOTOXINA SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO ESTIMULADA POR NMA. Los cortes se incubaron por tiempos definidos en LCR con TTX $1 \mu\text{M}$ en ausencia de NMA (\square) y con TTX $1 \mu\text{M}$ en presencia de NMA $150 \mu\text{M}$ (\triangle) según se indica en métodos. Los resultados con NMA + TTX no fueron estadísticamente diferentes de los obtenidos de la incubación con NMA solo (\bullet); (\circ) control. (* $p < 0,02$; ** $p < 0.001$, en relación al control), (Riveros y Orrego, 1986).

obteniéndose una diferencia solamente a los 20 min la cual no fue estadísticamente significativa. Cuando se realizó la incubación con TTX en ausencia de NMA, a los 5 min se produjo un aumento significativo de la velocidad de entrada de calcio con respecto al control. Esta estimulación fue menor que la producida por NMA en el mismo lapso de tiempo.

Estos experimentos sugieren que la entrada de calcio estimulada por glutamato y sus análogos sería a través de canales de calcio dependientes de voltaje, insensibles a nifedipina. Estos canales se abrirían en respuesta a la despolarización del terminal sináptico por entrada de sodio a través de canales insensibles a TTX.

E. EFECTO DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS Y DEPRESORAS DEL SNC SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO ESTIMULADA POR AMINOACIDOS EXCITADORES.

Ya que la activación de receptores por aminoácidos ácidos lleva a excitación neuronal, se estudió si sustancias endógenas inhibitoras como el ácido γ -amino butírico y la adenosina y compuestos depresores como el etanol, el pentobarbital y la morfina, que interfieren con el fenómeno de excitación neuronal y con los flujos de calcio en diferentes sistemas, eran capaces de modificar el efecto de compuestos excitadores .

a. EFECTO DE ACIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA). Las rebanadas se incubaron con diferentes concentraciones de GABA en presencia y ausencia de NMA. Los valores obtenidos de la incubación en presencia de diferentes concentraciones de GABA y en ausencia de NMA, muestran un

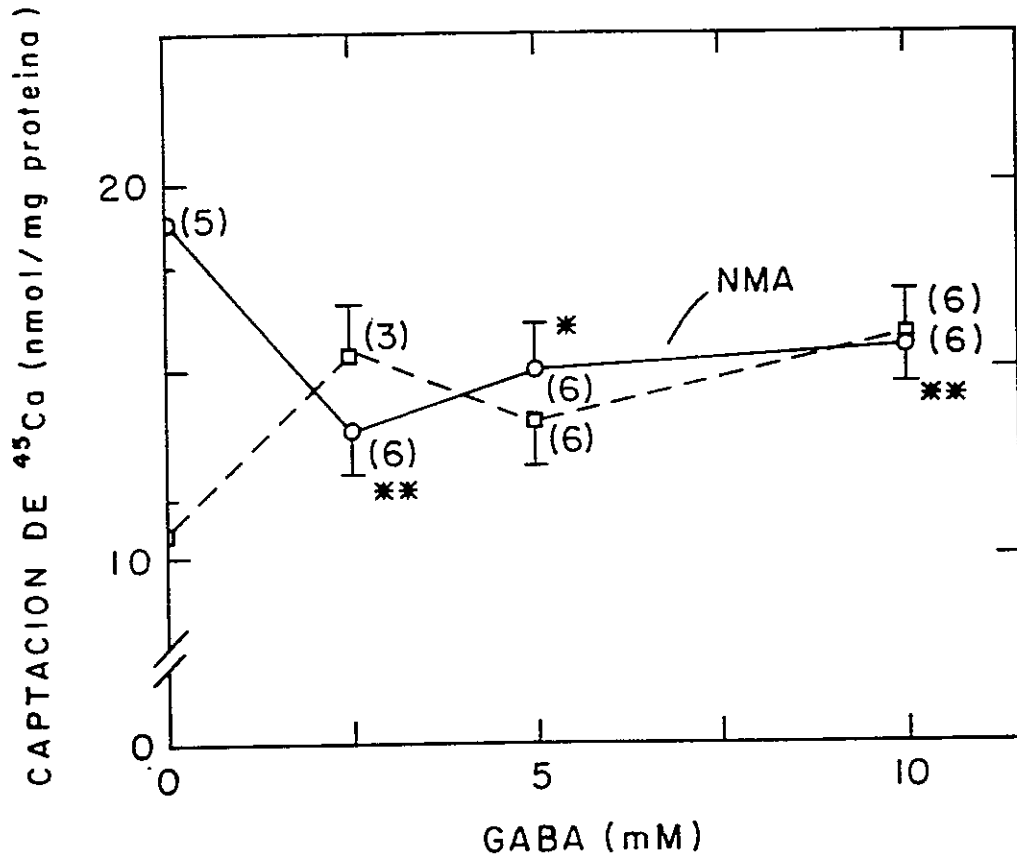


Figura 17. ACCION DE GABA SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO. Los cortes se incubaron por 10 min con las concentraciones de GABA que se muestran en presencia de $150 \mu\text{M}$ de NMA (\circ) o en ausencia de NMA (\square). Los valores obtenidos con GABA + NMA son significativamente menores que los obtenidos por incubación con NMA sólo (* $p < 0,02$; ** $p < 0,001$) mientras que los resultantes de la incubación con GABA solo no difieren de los obtenidos con GABA y NMA. Las condiciones de trabajo son las señaladas en los métodos (Riveros y Orrego, 1986).

aumento significativo de la captación de calcio en relación al control. Cuando las rebanadas se incubaron en presencia de NMA y GABA, la entrada de ^{45}Ca estimulada por NMA disminuyó a un nivel semejante al que se obtuvo cuando el estudio se hizo en presencia de GABA solo (Fig. 17).

b. EFECTO DE ADENOSINA. Los cortes se incubaron con diferentes concentraciones de adenosina en presencia y ausencia de NMA. Los resultados se muestran en la Fig 18. La adenosina al interactuar con su receptor produce inhibición de neuronas corticales, sin embargo no tuvo efecto sobre los canales de calcio activados por NMA. No se observaron variaciones en el flujo de calcio cuando se incubaron los cortes con adenosina sola.

c. EFECTO DE ETANOL. Se estudió el efecto de etanol sobre el flujo de calcio estimulado por glu, NMA y KA. En la Fig 19A se muestra el efecto de etanol en cortes incubados a diferentes tiempos en presencia de NMA. En la Fig 19B aparecen los resultados obtenidos de la incubación en presencia de glutamato. En la Fig 20 se ilustran los resultados obtenidos de la incubación de los cortes, en presencia de KA o de NMA por separado, usando concentraciones de etanol entre 3 y 100 mM.

Puede observarse que el etanol no produjo inhibición de la entrada de calcio estimulada por ninguno de los tres aminoácidos.

d. EFECTO DE PENTOBARBITAL. Se incubaron los cortes con pentobarbital en concentraciones entre 10^{-5} y 10^{-3}M , en presencia y ausencia de NMA, los resultados se muestran en la Fig 21. Puede observarse que el pentobarbital por si solo no modifica la entrada de calcio en

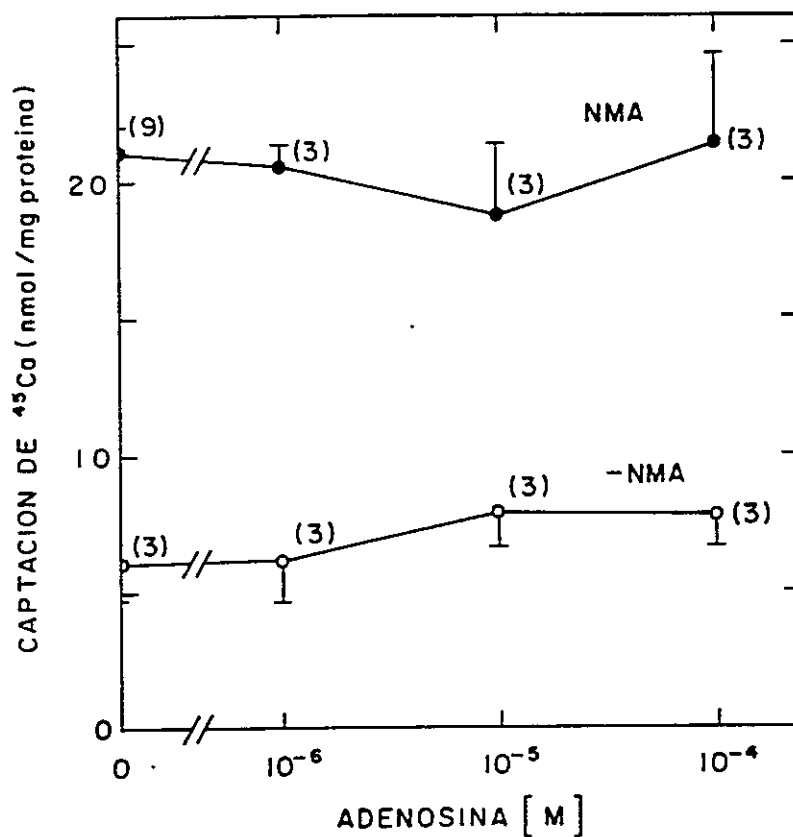


Figura 18. ADENOSINA Y ENTRADA DE CALCIO . Los cortes se incubaron por 10 min con las concentraciones de adenosina que se indican, en presencia de $150 \mu\text{M}$ de NMA (●) o en ausencia de NMA (○). Las condiciones de trabajo se señalan en métodos.

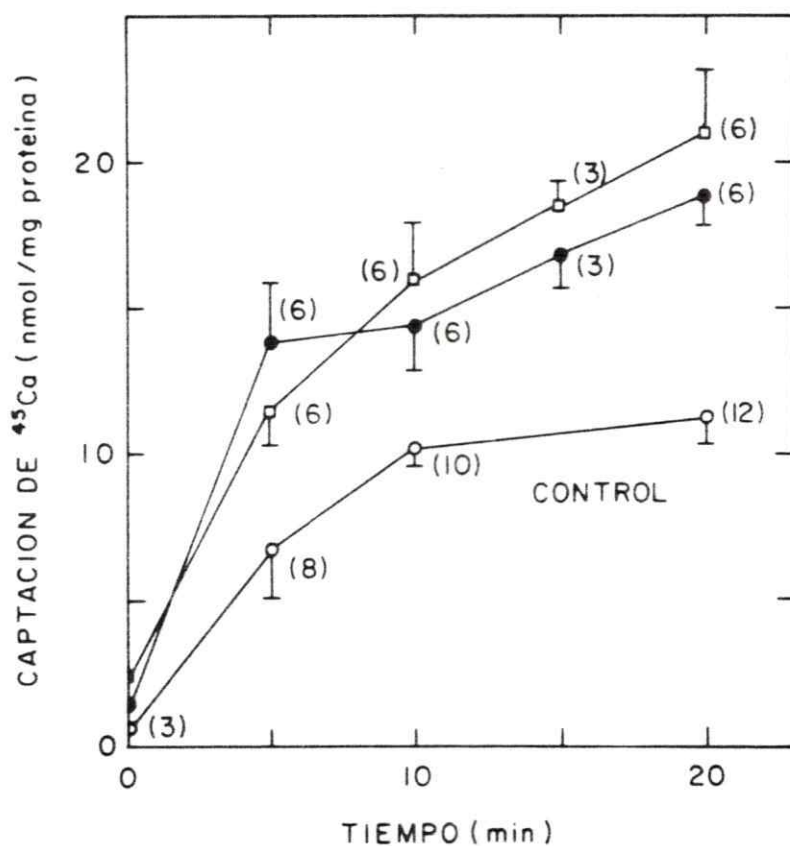


Figura 19A. EFECTO DE ETANOL SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO ACTIVADA POR NMA. Los cortes se incubaron por diferentes tiempos con NMA $150 \mu\text{M}$ en presencia de etanol (EtOH) $0,1 \text{ M}$ (□) y en ausencia de él (●). Las condiciones experimentales se describen en métodos (Riveros y Orrego, 1986).

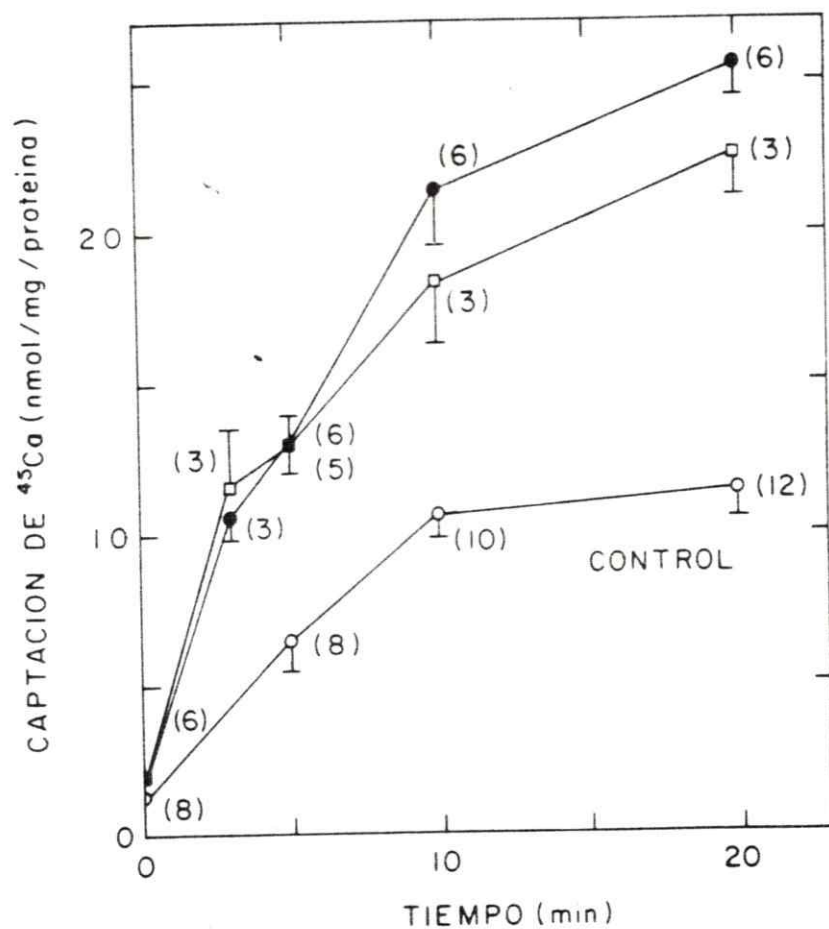


Figura 19B. EFECTO DE ETANOL SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO ACTIVADA POR GLUTAMATO. Los cortes se incubaron por diferentes tiempos con glu 5 mM en presencia de etanol 0,1 M (□) y en ausencia de él (●). Las condiciones experimentales se describen en métodos.

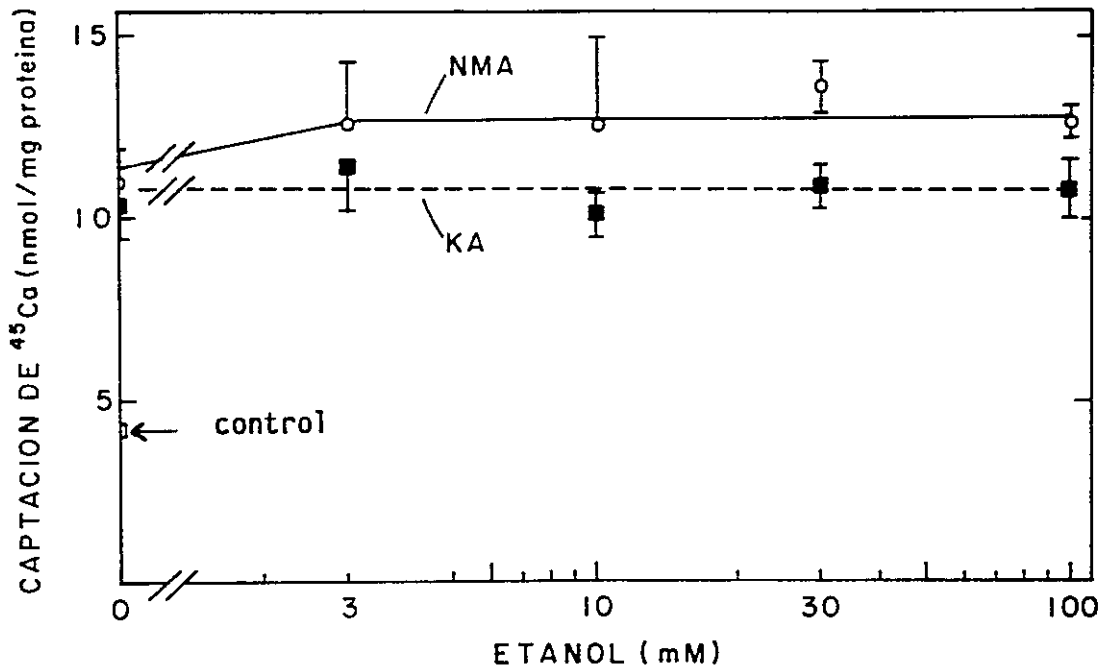


Figura 20. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ETANOL SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO ESTIMULADA POR NMA o KA . Todos los valores corresponden a mediciones efectuadas a los 3 min de incubación . En la ordenada se muestra la entrada de calcio en un experimento control, en ausencia de etanol y aminoácidos (■) y los valores en presencia de NMA 150 μ M (○) y KA 2,5 mM (■) en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de etanol. Las condiciones experimentales se describen en métodos.

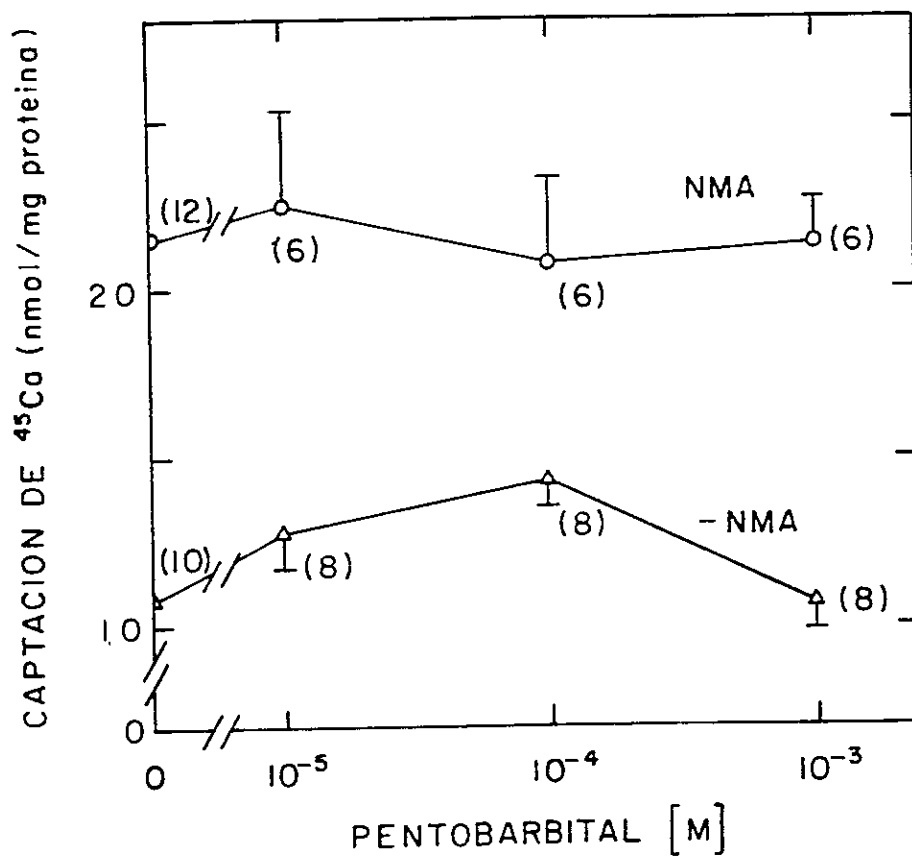


Figura 21. PENTOBARBITAL Y ENTRADA DE CALCIO. Los cortes se incubaron por 10 min con pentobarbital sódico en concentraciones entre 10^{-5} y 10^{-3} M en ausencia de NMA (Δ) y en presencia de NMA $100 \mu\text{M}$ (\circ). El número de experimentos se indica entre parentesis. Las condiciones empleadas se indican en métodos.

relación al control ni tampoco interfiere en la estimulación producida por NMA.

e. EFECTO DE MORFINA. Al incubar los cortes por 10 min con morfina 0.2 mM en presencia y ausencia de NMA, no se observó efecto sobre la entrada de calcio. La droga por sí sola no modificó el flujo basal de calcio y en presencia de NMA no alteró la estimulación producida por el aminoácido.

ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO EXCITADOR DEL N-ACETILASPARTILGLUTAMATO EN DIFERENTES PREPARACIONES DE CEREBRO, in vivo e in vitro.

El ácido N-acetilaspartilglutámico (NAAG) es un dipéptido que se encuentra en alta concentración en el cerebro. Este compuesto desplaza al L-³H-glutamato de su unión a membranas y produce convulsiones cuando se infunde estereotáxicamente en hipocampo de rata, por lo que se consideró la posibilidad de que fuese el neurotransmisor excitador que se une al receptor de kainato.

Se estudió el efecto de NAAG sobre la unión de ³H-KA a membranas de corteza cerebral de rata y posteriormente su efecto excitador tanto in vitro en cortes de corteza cerebral de rata, como in vivo mediante infusión estereotáxica de la droga en cerebro de gato.

EFECTO DE NAAG SOBRE LA UNIÓN DE ³H-KA A MEMBRANAS.

Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 4. Puede observarse que solamente hubo desplazamiento significativo de kainato a una concentración 10^{-3} M de NAAG, concentración muy alta como para atribuirle un valor fisiológico.

TABLA 4

EFFECTO DE N-ACETILASPARTILGLUTAMATO SOBRE LA UNION ESPECIFICA DE ^3H -KAINATO A MEMBRANAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.

NAAG (M)	Unión específica de ^3H -KA (% del control)	N
10^{-6}	$100,0 \pm 8,3$	(7)
10^{-5}	$97,3 \pm 9,9$	(7)
10^{-4}	$84,3 \pm 8,7$	(7)
10^{-3}	$42,8 \pm 5,7$	(7)

Se incubaron membranas sinápticas con 20 nM de G- ^3H -KA a 4°C por 20 min en ausencia de otro compuesto y en las mismas condiciones señaladas en la figura 4. Se determinó el desplazamiento de la unión de ^3H -KA en presencia de 0,1 mM de KA frío (control) o de diferentes concentraciones de NAAG. La solución de NAAG se preparaba en el momento de usarla y se neutralizaba con NaOH. Los resultados se expresan como un % de la unión específica del control. N representa el número de experimentos (Riveros y Orrego, 1984).

Ya que las membranas que se usaron en estos experimentos de unión son preparaciones bastante crudas, se estudió la posibilidad de que el desplazamiento de la unión de kainato pudiera deberse a glutamato generado por hidrólisis enzimática de NAAG. Al pasar una muestra de NAAG a través de un analizador de aminoácidos, en las condiciones descritas en los métodos, no se encontró glutamato libre. De igual modo se midió el contenido de glutamato y aspartato libre en membranas sinápticas de corteza, incubadas en las mismas condiciones en que se hizo el estudio de unión de kainato, en ausencia o en presencia de 27,3 nmoles de NAAG .

En el extracto ácido proveniente de la incubación sin NAAG se detectaron 18,5 nmoles de ácido aspártico y 23 nmoles de ácido glutámico como contaminantes de la preparación de membranas. Cuando la incubación se realizó en presencia de NAAG se observó que en el extracto se mantenía la concentración de ácido aspártico libre, 20,4 nmoles, en cambio la de glutamato aumentaba a 76,3 nmoles. Estos resultados se muestran en la Fig. 22, el registro corresponde a un análisis corrido hasta la aparición del glutamato en la columna. A partir de estos datos puede deducirse que el NAAG probablemente fue hidrolizado por alguna enzima presente en la preparación, estimándose la hidrólisis en un 0,2% del péptido agregado inicialmente.

De acuerdo a estos valores y considerando la magnitud de la hidrólisis, en un experimento en que se incuban las membranas con una solución 1 mM en NAAG podría producirse una concentración $2 \mu\text{M}$ de glutamato libre en el medio de ensayo. Esta concentración de glutamato referida a los estudios preliminares de desplazamiento de kainato

A. MEMBRANAS SINAPTICAS

B. MEMBRANAS + NAAG.

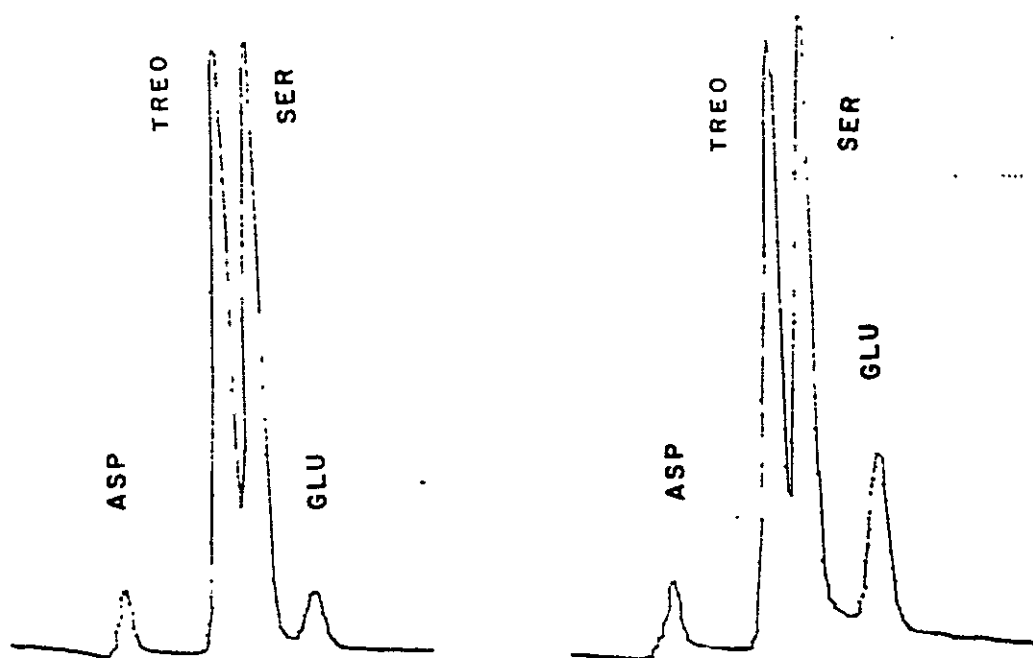


Figura 22 . MEDICION DE ACIDO ASPARTICO Y GLUTAMICO LIBRES EN MEMBRANAS SINAPTICAS DE CORTEZA CEREBRAL INCUBADAS CON o SIN NAAG. A. Las membranas correspondientes a 11,5 mg de proteínas se incubaron en 5 ml de amortiguador Tris-citrato pH 7,1, por 20 min a 4°C. La reacción se detuvo con TCA al 50% y se procedió como se indica en métodos. B. Se procedió como en A pero se incluyeron 27,3 μ moles de NAAG durante la incubación. En ambos casos la muestra se corrió hasta la aparición de glutamato (Riveros y Orrego, 1984).

por este aminoácido, debiera producir una inhibición del 41,4% de la unión de kainato.

La hidrólisis de NAAG y la liberación de glutamato son fenómenos que proceden durante la incubación y es muy posible por lo tanto que no se alcance un equilibrio pero, en cualquier caso, la inhibición producida por NAAG 1 mM podría explicarse en gran parte por la hidrólisis del dipéptido.

EFFECTO DE NAAG SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO A REBANADAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA.

Dado que al NAAG se le atribuye un efecto excitador sobre el sistema nervioso central y que los aminoácidos excitadores aumentan el flujo de ^{45}Ca en cortes de corteza cerebral de rata, se ensayó el efecto de NAAG sobre este sistema. Los resultados se muestran en la Fig.23. Puede observarse que el dipéptido por si solo no modifica el flujo de ^{45}Ca .

Pensando que la acción excitadora descrita para el NAAG podría no ser un efecto directo de la droga sino una potenciación de la activación producida por glutamato, se hizo un experimento en que se agregaban simultáneamente 1,25 mM de NAAG y una concentración submáxima de glutamato (0,5 mM). En este caso tampoco se observó una diferencia entre la curva de estimulación por glutamato y la obtenida por incubación con ambas drogas, por lo que se descartó la posibilidad de un sinergismo entre ellas.

EFFECTO DE NAAG Y ACIDO GLUTAMICO EN CEREBRO DE GATO, in vivo. Se ha descrito que la inyección de NAAG en hipocampo de rata produce

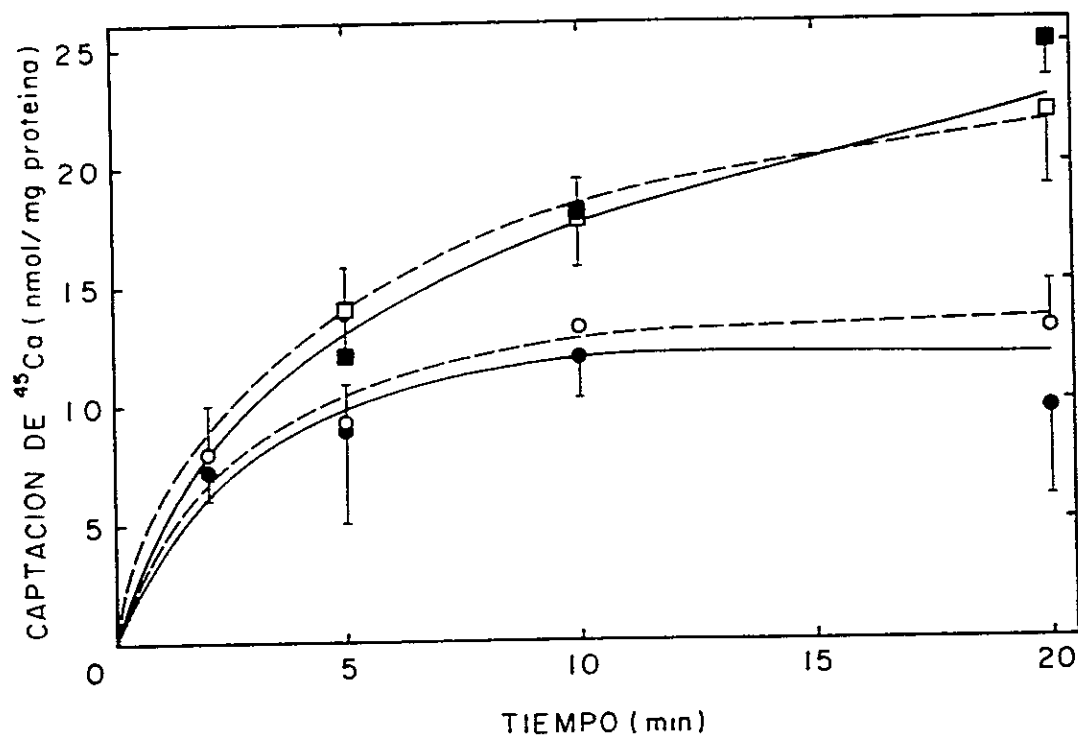


Figura 23. INFLUENCIA DEL NAAG SOBRE LA ENTRADA DE CALCIO A CORTES DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. Los cortes de corteza se incubaron en 1 ml de solución salina glucosada A, en presencia de 0,37 uCi de ^3H -inulina y 500.000 cpm de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por los tiempos indicados, en la misma forma que se realizó el experimento de la figura 12. Las curvas corresponden a la captación de calcio en ausencia del aminoácido y de NAAG (o), en presencia de 1,25 mM NAAG (●), en presencia de 0,5 mM de glu y 1,25 mM NAAG (■) y de 0,5 mM glu sólo (□), (Riveros y Orrego, 1984).

convulsiones (Zaczek y col., 1983). Se pensó que esta manipulación podría romper el tejido liberando enzimas que podrían hidrolizar el di péptido in situ, de manera análoga a lo observado en la incubación de éste con la preparación de membranas. El producto de esta hidrólisis podría ser el responsable de la excitación neuronal.

Se estudió esta posibilidad mediante la infusión de la droga a través de una cánula implantada en forma permanente en diferentes áreas de cerebro de gato. Esta implantación crónica, después de un cierto período de recuperación del animal, permite mejores condiciones para el estudio del efecto de la droga. Estos experimentos se realizaron en dos gatos en que las cánulas y los electrodos se implantaron en diferentes zonas del cerebro que reciben aferencias excitadoras (Ver métodos).

En el gato en que la cánula se implantó en el hipocampo, la inyección de 10 y 100 μg de NAAG no produjo cambios en la actividad eléctrica de hipocampo, pulvinar ni corteza, durante un período de registro de 30 min. La infusión de 70 μg de glutamato de sodio (0,5 M, pH 7,2) produjo una activación inmediata detectada en el electroencefalograma. El efecto se observó especialmente en el hipocampo, donde aparecieron ondas de mayor frecuencia y amplitud en relación al control. En pulvinar y corteza se vió un efecto de menor magnitud. La activación duraba 5,2 min. en promedio y luego la actividad eléctrica de estas estructuras se normalizaba. Estos experimentos se hicieron 9 veces, obteniéndose resultados muy claros en 6 de ellos. En el mismo animal se ensayó la infusión de una mezcla de 1000 μg de NAAG y 70 μg de glutamato. En 4 de 7 experimentos se detectó activación de las

estructuras cerebrales, no observándose ningún efecto en los 3 restantes. La activación en este caso duraba 2,7 min.

Los resultados se muestran en las fig 24A y 24B en que aparecen los registros electroencefalográficos efectuados luego de infundir glutamato y glutamato más NAAG, incluyéndose el registro control que se obtenía por infusión de 1 μ l de la solución fisiológica en que se disolvían las drogas. No se incluye el registro obtenido en presencia de NAAG solo, pero este era prácticamente idéntico al registro control.

En el segundo animal en que la cánula se implantó en el núcleo pulvinar derecho del tálamo, el glutamato activó el EEG por 45 s y fue inactivo en una segunda aplicación efectuada 9 días después. La infusión de la mezcla de NAAG y glutamato fue inactiva en ambas oportunidades al igual que la infusión de 10 y 100 μ g de NAAG. En ningún experimento se observaron cambios conductuales en los animales, luego de la aplicación de las drogas.

Dos semanas después de finalizar estos experimentos se infundieron a través de la cánula 5, 10 y 20 μ g de carbacol en diferentes sesiones, en todos los casos se produjeron intensas crisis epilépticas, lo que demuestra que las estructuras no estaban dañadas por la implantación de la cánula y eran muy sensibles a otras drogas. Posteriormente se realizó un examen histológico del cerebro de estos animales y se verificó que las inyecciones se habían realizado en las áreas deseadas.

De estos experimentos con NAAG in vivo e in vitro podemos deducir que el dipéptido no tiene efecto excitador por sí solo y no potencia ni antagoniza el efecto de L-glutamato.

CONTROL

GLUTAMATO



HIPOCAMPO



Pulvinar



CORTEZA

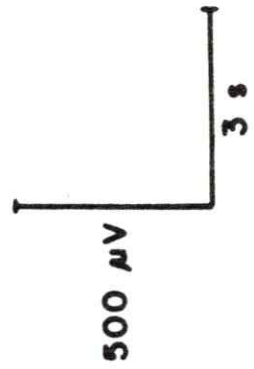
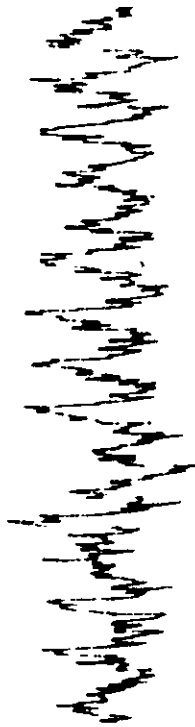


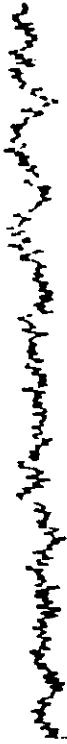
Figura 24A. REGISTRO ENCEFALOGRAFICO DEL EFECTO PRODUCIDO POR LA INYECCION DE GLUTAMATO EN HIPOCAMPO DE GATO, in vivo. Leyenda en página siguiente.

CONTROL

GLUTAMATO + NAAG



HIPOCAMPO



Pulvinar



CORTEZA

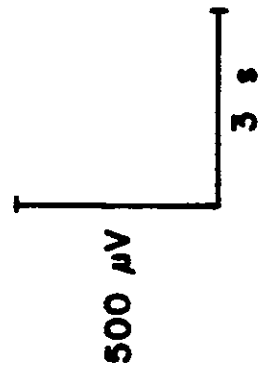


Figura 24B. REGISTRO ENCEFALOGRAFICO DEL EFECTO PRODUCIDO POR LA INYECCION DE GLUTAMATO Y NAAG EN HIPOCAMPO DE RATA, in vivo. Leyenda en página siguiente.

Figura 24A y 24B. REGISTRO ENCEFALOGRAFICO DEL EFECTO PRODUCIDO POR LA INYECCION DE GLUTAMATO Y NAAG EN HIPOCAMPO DE GATO, in vivo. El animal se preparó como se indica en Material y Métodos. Las drogas se disolvieron en el medio fisiológico N y se administraron al animal mediante una cánula implantada en el hipocampo. Los registros efectuados en las zonas que se indican corresponden al efecto de:

A. inyección de 1 μ l de medio fisiológico más 70 ug de glutamato (0,5 M, pH 7,2) .

B. inyección de 1 μ l de medio fisiológico más 70 ug de glutamato y 100 ug de NAAG. En ambos casos se incluye un registro control que se obtuvo por infusión de 1 μ l de solución N.

D I S C U S I O N

BUSQUEDA DE LA SUSTANCIA ENDOGENA EXCITADORA QUE SE UNE A LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO EN EL SNC.

La caracterización de una sustancia endógena que en el SNC se une a los mismos receptores que el glutamato y el aspartato reviste gran interés, considerando su posible papel como neurotransmisor excitador y por la relación que pudiera existir entre la alteración de su metabolismo y la etiología de ciertas enfermedades neurodegenerativas en el hombre.

Al inicio de esta tesis, a pesar de los numerosos trabajos que sugerían que el glutamato y el aspartato eran transmisores nerviosos en ciertas vías específicas del SNC, no parecía tan claro que ambos compuestos, tan abundantes y ampliamente distribuidos en el organismo y con funciones metabólicas tan importantes, pudiesen además estar implicados en la transmisión sináptica.

Los estudios electrofisiológicos mostraban la existencia de receptores que unían glutamato y análogos del aminoácido tales como kainato, quisqualato y N-metilaspartato. Estos compuestos poseen propiedades excitadoras sobre el SNC y se pensó que los sitios de unión de ellos a membranas sinápticas podrían unir también al transmisor natural que actúa fisiológicamente a este nivel. Si así fuera, el transmisor natural debiera desplazar al kainato, al quisqualato o al

N-metilaspartato unidos a sus receptores específicos en la membrana.

A. UNIÓN DE ^3H -KAINATO A MEMBRANAS.

La unión de ^3H -kainato a su receptor está bien caracterizada y se ha descrito como saturable y de alta afinidad. En este trabajo de tesis se usó este sistema de unión del ^3H -KA a membranas para la detección de la sustancia endógena activa buscada.

Gran parte de los experimentos se realizaron usando preparaciones frescas de membrana ya que los receptores se inactivaban en un 50% cuando se almacenaban durante la noche a -20°C . Esta inestabilidad del receptor, sumada a la baja sensibilidad del método, constituyó un problema serio al comienzo de este trabajo. Los mejores resultados, en cuanto a la magnitud de la unión específica del ligando y a la estabilización del receptor, se obtuvieron sonicando las membranas luego del tratamiento hiposmótico contemplado en la preparación de ellas y almacenándolas posteriormente como polvo liofilizado a -20°C .

Las características generales de la unión de ^3H -KA a la preparación de membranas sinaptosomales de corteza cerebral de rata, coincidieron plenamente con las descritas por Simon y col. (1976). La unión específica de ^3H -KA representaba un 25-50% de la unión total, valores semejantes a los descritos por estos autores en corteza cerebral. La especificidad farmacológica del receptor, que presenta una afinidad mil veces mayor por kainato que por glutamato y no posee afinidad por aspartato, coincidió con lo descrito en la literatura. Los valores de IC_{50} para glutamato y kainato fueron de $4\ \mu\text{M}$ y $4\ \text{nM}$ respectivamente. Los que aparecen en diferentes estudios del receptor de kainato fluctúan entre $0,7$ y $2\ \mu\text{M}$ para glutamato y 19 y $72\ \text{nM}$ para

kainato (Foster y Roberts, 1978; Simon y col., 1976; London y Coyle, 1979).

Tanto para la unión de glutamato como para la de kainato al receptor de kainato se obtuvo un número de Hill (n_H) cercano a 0,6. Este valor podría representar la existencia de más de un sitio de unión con distinta afinidad para cada sustancia o la presencia de dos sitios de unión para la misma sustancia que interactuarían entre sí con cooperatividad negativa. Actualmente se acepta la existencia de varios tipos de sitios de unión de glutamato que unen kainato con distinta afinidad (ref. en Foster y Fagg, 1984; Fagg y col., 1986).

La inactivación del receptor de kainato por tratamiento con Tritón X-100 coincidió con lo descrito por London y Coyle (1979), quienes trataron las membranas con desoxicolato.

B. UNIÓN DE ^3H -N-METIL-D,L-ASPARTATO A MEMBRANAS.

En estudios electrofisiológicos, farmacológicos y autoradiográficos se ha mostrado la existencia de receptores que unen NMA en zonas específicas del SNC (Monaghan y col., 1983; ref. en Fagg y col., 1986). En esta tesis no se logró caracterizar este receptor en los términos que se hizo con el de kainato. Se analizó la unión de ^3H -NMA en diversas condiciones de ensayo, utilizando membranas provenientes de distintas regiones del cerebro y también una preparación de membranas de médula espinal, detectándose unión específica del ligando únicamente con esta última preparación.

La unión específica del NMA al receptor de médula, aunque reproducible en varios experimentos, nunca superó a un 10% de la unión total.

Sobre la base de este resultado se descartó la idea inicial de utilizar este sistema para la detección del compuesto que interactuaría fisiológicamente con el receptor de NMDA, ya que en el SNC es probable que esta sustancia endógena esté en una concentración muy baja.

Se ha observado que la unión de NMA al receptor de membrana es muy selectiva pero de baja afinidad, siendo por lo menos 10 veces menor que la del L-glutamato y prácticamente la misma que la del L-aspartato (Olverman y col., 1984). Esto explicaría en parte la dificultad que presentó realizar el estudio propuesto.

Foster y Fagg, en una revisión del año 1984 comentan la existencia de un sólo trabajo, publicado como resumen de una presentación a congreso en el que se describe la unión de ^3H -NMA a membranas. Los resultados que allí aparecen no han podido reproducirse.

La unión de NMA a membranas de médula obtenida en este trabajo de tesis constituye, hasta el momento, el único resultado positivo en cuanto a la unión del compuesto a este receptor.

C. ACIDO N-ACETILASPARTILGLUTAMICO COMO POSIBLE SUSTANCIA ENDOGENA QUE SE UNE AL RECEPTOR QUE UNE KAINATO Y GLUTAMATO.

Los trabajos orientados a demostrar la participación del N-acetilaspartilglutamato (NAAG), en la neurotransmisión excitadora en el SNC, muestran que este compuesto se une específicamente a membranas de cerebro de rata (Zaczek y col., 1983; Blakely y col., 1986), presenta distribución regional (Curatolo y col., 1965), posee características farmacológicas similares a aquellas del neurotransmisor excitador endógeno que opera en el tracto olfatorio lateral y

produce convulsiones al ser infundido en hipocampo de rata.

Al estudiar la unión de NAAG a membranas de cerebro de rata, Zaczek y col. (1983), determinan que una concentración 10 μ M de NAAG, purificado por HPLC (cromatografía líquida de alta presión), produce un desplazamiento del 55% del 3 H-glutamato unido a receptores mesencefálicos.

En los experimentos de esta tesis en que se investigó el efecto de concentraciones crecientes de NAAG sobre la unión de 3 H-KA a membranas de corteza cerebral de rata, pudo observarse un desplazamiento significativo de esta unión solamente cuando se usaron altas concentraciones del péptido (1 mM), lo que resta valor a los resultados en el contexto de un proceso fisiológico normal. En estos experimentos se usó una preparación de membranas sinaptosomales bastante cruda por lo que se consideró la posibilidad de que en ella hubiesen peptidasas que podrían hidrolizar el NAAG, generando glutamato y que este podría competir con el kainato por el receptor. Previo control de la pureza del NAAG en cuanto a su contaminación con glutamato y aspartato, se determinó la concentración de estos aminoácidos en extractos provenientes de la incubación de las membranas en presencia y ausencia de NAAG, en las mismas condiciones usadas para el estudio de unión de kainato. Se observó que la concentración de aspartato libre era la misma en ambos casos, en cambio, la de glutamato aumentaba 3 a 4 veces cuando se incubaba en presencia de NAAG. La magnitud de la hidrólisis se estimó en un 0.2% del NAAG agregado inicialmente, por lo que con una concentración 1 mM podría generarse suficiente glutamato en el medio como para producir el desplazamiento de la unión de kainato observado.

Recientemente, el grupo de Coyle ha estudiado la captación sinaptosomal del NAAG como posible mecanismo específico de término de la señal transmitida por el péptido (Blakely y col., 1986). Al incubar una preparación sinaptosomal en presencia del NAAG marcado en el N-acetilo no observan radiactividad en el sinaptosoma, a diferencia del resultado que obtienen cuando incuban con el péptido marcado en el glutamato. Manteniendo su hipótesis en relación a la función neurotransmisora del NAAG, los autores proponen la existencia de una peptidasa acoplada al sistema de transporte de glutamato, la cual hidrolizaría al compuesto generando glutamato, el que sería rápidamente captado por el terminal presináptico mediante un proceso dependiente de Na^+ , temperatura y tiempo. Por el momento no hay suficiente apoyo experimental para esta proposición, pero queda clara la existencia de peptidasas asociadas de alguna forma al terminal sináptico, el producto de cuya acción puede llevar a interpretaciones erróneas en relación al papel fisiológico del NAAG.

En cuanto a la capacidad convulsivante del NAAG que ellos describen, la inyección directa del péptido en el hipocampo podría dañar el tejido y esto traducirse en la liberación de peptidasas que aumentarían la concentración local de glutamato. El producto de la hidrólisis podría ser el responsable de la excitación neuronal observada y explicaría el largo tiempo de latencia, que transcurre entre la administración de la droga y la aparición del efecto que ellos observan.

Los experimentos que se muestran en esta tesis se realizaron en animales a los que se implantó la cánula en forma permanente, una

semana antes de administrarles la droga, a fin de permitir la recuperación del tejido dañado.

En estas condiciones la aplicación de 10 y 100 μg de NAAG en el hipocampo no produjo cambios conductuales en los animales ni tampoco variaciones en la actividad eléctrica del hipocampo, del pulvinar ni de la corteza durante un período de registro de 30 min. La infusión de 70 μg de glutamato de sodio, en cambio, produjo una activación inmediata. La administración simultánea del glutamato y del péptido no produjo potenciación ni disminución del efecto del aminoácido.

De acuerdo a experimentos previos, que son parte de este trabajo y a datos de la literatura que muestran la estimulación del flujo de calcio por acción de los aminoácidos excitadores, se ensayó el efecto del NAAG, presunto neurotransmisor excitador, sobre la entrada de Ca^{2+} a cortes de corteza cerebral de rata. El péptido no modificó el flujo de calcio ni potenció el efecto estimulador producido por el glutamato.

De estos estudios realizados con NAAG administrado in vivo e in vitro podemos deducir que el dipéptido no tiene efecto excitador y no potencia ni antagoniza el efecto del L-glutamato. El efecto observado por el grupo de Coyle se debería fundamentalmente al aumento local de la concentración de glutamato generado por hidrólisis enzimática del compuesto.

Baud y Fagg (1986), en un trabajo reciente, estudian el efecto de dipéptidos que contienen glutamato sobre la unión de aminoácidos excitador a receptores de membrana y determinan, mediante el uso de inhibidores de peptidasas, que el efecto que observan no se debe al péptido mismo sino al L-glutamato liberado por acción enzimática.

Existen otros datos que estarían en contra de la participación del NAAG en la neurotransmisión. El compuesto está presente en gran cantidad en cerebro de conejo, pero su concentración es mayor en la sustancia blanca que en la sustancia gris. En el cerebro humano el contenido del dipéptido es semejante en sustancia blanca y en sustancia gris, pero no existe diferencia regional de este contenido en distintas áreas cerebrales. En cuy la concentración de NAAG no varía durante el desarrollo del animal desde el estado fetal al estado adulto, a pesar del enorme aumento en la densidad de terminales sinápticos. Por último, la localización celular del NAAG en el compartimento citoplasmático soluble no corresponde a la establecida para la mayoría de los neuropéptidos, los que se encuentran concentrados en vesículas sinápticas (Reichelt y Fonnun, 1969 ; Miyake y col., 1981).

D. PRESENCIA DE UNA SUSTANCIA CONTENIDA EN VESICULAS SINAPTICAS QUE SE UNE AL MISMO RECEPTOR QUE EL KAINATO.

La búsqueda del neurotransmisor que se une al receptor de kainato se inició en un extracto de vesículas sinápticas, puesto que todos los neurotransmisores bien caracterizados en el SNC, tales como la dopamina, acetilcolina, noradrenalina y muchos neuropéptidos, están almacenados en vesículas que los concentran y protegen de la degradación enzimática.

En la mayor parte de los trabajos en que se ha determinado el contenido de aminoácidos y péptidos en vesículas sinápticas, éstas se han preparado de acuerdo al método de Whittaker y col., (1964), que consiste básicamente en una combinación de centrifugación diferencial con centrifugación a través de un gradiente de concentración de

sacarosa. Las preparaciones, al ser observadas por microscopía electrónica, presentan una población más o menos homogénea de vesículas, de un tamaño semejante al descrito para las vesículas sinápticas. En estas preparaciones se han detectado vesículas formadas por membrana plasmática resellada, las que por tener un tamaño semejante al de las vesículas sinápticas son difíciles de separar de ellas. Los métodos que incluyen numerosas centrifugaciones y lavados provocan generalmente el vaciamiento de las vesículas e invariablemente se ha observado que a mayor pureza de la preparación menor o nulo es el contenido de aminoácidos en ellas.

La mayor parte de los experimentos que se muestran en esta tesis se realizaron con vesículas obtenidas por el método de Hata y col., (1976) que es más rápido que otros descritos en la literatura, lo que parece crucial para disminuir el vaciamiento del contenido vesicular. Aunque esta preparación de vesículas tenía un grado de contaminación apreciable con membrana citoplasmática resellada, los resultados obtenidos con ella, en relación al ligando buscado, son plenamente coincidentes con los que se lograron posteriormente con una preparación altamente purificada (Riveros y col., 1986).

Considerando que los neurotransmisores clásicos son moléculas simples de peso molecular de alrededor de 200 y que muchas sustancias propuestas como neurotransmisores son péptidos, la extracción del contenido de las vesículas se realizó por calentamiento de ellas a 90°C por 7 min en medio acuoso, condiciones en que se altera la estructura de la membrana plasmática, precipitan las proteínas y quedan los péptidos y sustancias de bajo peso molecular en solución.

El extracto así obtenido contenía una sustancia que fue capaz de desplazar la unión de $^3\text{H-KA}$ en forma específica, siendo este desplazamiento proporcional a la cantidad de extracto utilizado.

Existe por lo tanto una sustancia dentro de las vesículas que es capaz de unirse al mismo receptor que un kainato.

E. CARACTERIZACION DE LA SUSTANCIA ACTIVA PRESENTE EN VESICULAS SINAPTICAS.

La caracterización preliminar de la sustancia presente en vesículas sinápticas y que desplaza al kainato unido a su receptor se realizó fraccionando el extracto a través de una columna de Sefadex G-10, por cromatografía en capa fina y por electroforesis de alto voltaje en papel.

Se observó que el compuesto activo tenía un peso molecular bajo, ya que era retardado en la columna de Sefadex G-10 que excluye las moléculas de peso molecular mayor que 700 Da. El compuesto coeluyó con el glutamato radiactivo usado como marcador interno.

En el caso de la electroforesis, mediante el uso de soluciones de distinta composición y pH, se consiguió separar el aspartato del glutamato, observándose que la fracción activa del extracto comigraba con este último aminoácido.

Los resultados del fraccionamiento del extracto por cromatografía en capa fina fueron semejantes a los obtenidos mediante las otras dos técnicas.

Esto indicaría que el único componente endógeno activo contenido en vesículas sinápticas y que se une al receptor de kainato presente en membranas de corteza cerebral de rata es el ácido glutámico.

Este trabajo fue el primero en mostrar la presencia de cantidades sustanciales de glutamato en vesículas sinápticas y representa un fuerte apoyo a su papel como neurotransmisor.

F. PURIFICACION PARCIAL DE LAS VESICULAS SINAPTICAS.

A fin de purificar las vesículas sinápticas preparadas por el método de Hata, se fraccionó la preparación en una columna de Sefarosa 4 B. Las vesículas sinápticas eluían en el volumen vacío, junto a las vesículas de membranas reselladas. La presencia de vesículas sinápticas en las fracciones que coincidían con las de mayor concentración de proteínas, se detectaba por la aparición de ^3H -Noradrenalina cuando las vesículas se marcaban previamente con el compuesto radiactivo.

El contenido de glutamato en la fracción particulada proveniente de la filtración por Sefarosa 4B fue de 350 nmoles por gramo de corteza cerebral y el de glutamato libre, de 15,3 nmoles, ambos valores expresados en relación al peso del tejido húmedo original.

Si consideramos el contenido citoplasmático de glutamato por gramo de tejido húmedo de corteza cerebral que aparece en la bibliografía, 10 μmoles por g de tejido húmedo (Benjamín y Quastel, 1972) y el que se detectó en vesículas sinápticas, calculado de acuerdo a la curva de desplazamiento de la unión de ^3H -KA por glutamato, tendríamos que el 3,5% del glutamato total del tejido se recuperó en la fracción vesicular.

La fracción particulada tenía una contaminación apreciable con fragmentos de membrana plasmática como pudo comprobarse mediante la observación de ella al microscopio electrónico (no se muestra).

Por otra parte la unión de ^3H -ouabaina, marcador de membrana plasmática, fue de 1310 ± 128 fmoles por mg de proteína. Este valor es muy grande si se considera que la preparación de membrana plasmática purificada de túbulo transverso de riñón o de músculo esquelético de mamífero une 150 pmoles de ouabaina por mg de proteína, en las mismas condiciones experimentales (Hidalgo y de la Fuente, comunicación personal).

Cabía preguntarse por lo tanto, cuanto del glutamato encontrado en la fracción que contenía las vesículas sinápticas estaba originalmente dentro de estas vesículas y cuanto correspondía a glutamato atrapado desde el citoplasma al resellarse la membrana plasmática durante el procesamiento del tejido. Considerando la gran concentración citoplasmática del aminoácido en corteza de rata, esta contaminación podría ser considerable y dar cuenta de la presencia de glutamato en la fracción vesicular.

Teniendo en cuenta esta posibilidad se incluyó ^3H -glutamato en el medio de homogeneización desde el comienzo de la preparación de vesículas suponiendo que éste sería atrapado en las vesículas de membrana resellada junto al glutamato citoplasmático y en proporción a él. Las vesículas se filtraron a través de una columna de Sefarosa 4B. Se observó que la fracción particulada proveniente de esta filtración sólo contenía un 0,1% del aminoácido tritiado agregado al medio de homogeneización. Ya que el 3,5% del glutamato total de corteza aparecía en la fracción particulada, se calculó que alrededor del 2,9% del glutamato presente en las partículas aisladas por filtración en Sefarosa 4B se debería a glutamato atrapado en vesículas de membrana.

plasmática resellada. Por lo tanto habrían 340 nmoles de glutamato en las vesículas sinápticas provenientes de 1 g de tejido original.

Se ensayó posteriormente otro procedimiento para preparar las vesículas en el cual los terminales axónicos no se rompen por shock hiposmótico sino mediante una homogeneización energética en un medio isoosmótico (Seidler y col., 1977). Las vesículas obtenidas luego de fraccionar esta preparación a través de una columna de Sefarosa 4B, unieron 123 ± 10 fmoles de ouabaína por mg de proteína. La contaminación con membranas reselladas al suprimir el tratamiento hiposmótico es mucho menor que en la preparación anterior, pero el contenido de glutamato en estas vesículas es prácticamente nulo apareciendo en cambio una gran cantidad del aminoácido en las fracciones donde eluye el glutamato no particulado. Este resultado puede atribuirse a las condiciones drásticas de homogeneización que probablemente dañan la estructura de las vesículas.

G. CUANTIFICACION DEL GLUTAMATO CONTENIDO EN VESICULAS SINAPTICAS.

Basándose en los resultados presentados, que muestran que efectivamente hay glutamato en las vesículas sinápticas de varias zonas del SNC, se continuaron estos estudios con el fin de cuantificar el contenido del aminoácido en ellas. Se usaron vesículas preparadas de acuerdo al método de Kadota y Kadota (1973), las que presentaban un alto grado de pureza. En esta preparación los sinaptosomas se someten a un tratamiento hiposmótico por un período muy corto, tras el cual se restituye la osmolaridad del medio.

La preparación luego de ser cromatografiada por Sefarosa 4B presentaba un aspecto homogéneo al microscopio electrónico, sin

vesículas de membranas reselladas. La unión de ouabaina fue de 37,2 fmoles por mg de proteína, lo que indicaba una contaminación mínima. El rendimiento sin embargo fue menor que el obtenido con los otros dos métodos (Riveros y col., 1986).

Los experimentos realizados usando estas vesículas puras dieron resultados plenamente coincidentes con los que ya se han descrito. Al someter el extracto vesicular a electroforesis de alto voltaje se detectó glutamato en ellas, como único ligando capaz de unirse al receptor de kainato.

Usando ^3H -kainato de alta actividad específica, se pudo determinar el contenido del aminoácido en cada fracción que eluía de la columna de Sefarosa 4B (Ver figura en el apéndice).

Conociendo la cantidad de glutamato y la concentración de proteínas de cada fracción pudo determinarse la concentración del aminoácido en una vesícula sináptica. Considerando el volumen interno de una vesícula igual a $2,87 \times 10^7 \text{ \AA}^3$ y el número de moléculas por vesícula igual a 3640, la concentración intravesicular de glutamato sería de 0,21 M. Este valor es por lo menos 10 veces mayor que la concentración extravesicular, estimada como 21,1 mM (ver cálculos en el apéndice y en Riveros y col., 1986). Esta estimación incluye naturalmente al aminoácido presente en las vesículas, por lo que la relación de concentraciones debe ser aún mayor. Debe considerarse además que durante el transcurso de la preparación las vesículas pierden parte de su contenido original, lo que contribuiría a subestimar la cantidad de glutamato en ellas presente.

La búsqueda de glutamato en vesículas sinápticas no es original. Existen varios trabajos en la literatura orientados a demostrar

la presencia del aminoácido en estas estructuras, hallazgo que por una parte apoyaría fuertemente su papel como neurotransmisor y por otra constituiría un aporte experimental más a la hipótesis vesicular de la liberación de los neurotransmisores (De Belleruche y Bradford, 1973; Storm Mathissen y col., 1983; Lådesmäki y col., 1977; Karppinen y col., 1980; Kontro y col., 1980).

Mangan y Whittaker (1966), Kontro y col., (1980) y Lådesmäki y col., (1977) determinan una concentración de alrededor de 2 nmoles de glutamato y de 0,1 a 0,8 nmoles de aspartato por gramo de tejido húmedo original. Estas mediciones las efectúan en vesículas sinápticas de corteza cerebral de ternero preparadas de acuerdo al método de Whittaker.

De Belleruche y Bradford (1973), usando vesículas sinápticas de corteza cerebral de buey, encuentran 15,7 nmoles de glutamato y 3,97 nmoles de aspartato por gramo de tejido húmedo. Estos valores a pesar de ser superiores a los citados anteriormente, no son indicativos de una función específica de estos aminoácidos y bien podrían representar una contaminación de la preparación con glutamato citoplasmático.

Kvamme y Lenda (1981), cuantifican el contenido de glutamato libre y compartimentalizado en una preparación de sinaptosomas de cerebro de rata, obtenida de acuerdo al método de Whittaker. Los autores miden la inhibición de glutaminasa por glutamato en sinaptosomas enteros y rotos y deducen que la mayor parte del glutamato sinaptosomal está compartimentalizado y en una concentración aproximada de 3,5 mM. De acuerdo a estos trabajos, el glutamato citoplasmático tendría

una concentración de 0,5 mM.

Cabe señalar la validez de los resultados obtenidos por nosotros, con las vesículas preparadas según Hata, pues si bien la preparación estaba contaminada con vesículas de membranas reselladas, según nuestros estudios, la concentración del glutamato citoplasmático es por lo menos diez veces menor que la de las vesículas sinápticas y el posible aminoácido atrapado sería cuantitativamente poco significativo frente al gran contenido de glutamato vesicular.

Hasta el momento, esta concentración de glutamato es la más alta que se haya encontrado para un neurotransmisor contenido en vesículas sinápticas de cerebro de mamífero (Riveros y col., 1986).

La presencia de receptores postsinápticos bien caracterizados, los efectos fisiológicos descritos y este hallazgo de glutamato en vesículas sinápticas prueban que este aminoácido es un neurotransmisor central.

La presencia de glutamato en vesículas sinápticas no puede interpretarse en términos de la hidrólisis del NAAG endógeno ya que no existen peptidasas dentro de este organelo. Por otra parte, la caracterización de la sustancia que se une al receptor de kainato se hizo a partir de un extracto obtenido por calentamiento de las vesículas a 90°C por 7 min, tras lo cual es poco probable que en él se encuentre alguna enzima activa.

H. CAPTACION DE GLUTAMATO POR VESICULAS SINAPTICAS.

Se estudió si las vesículas preparadas según el método de Hata y col.,(1976) eran capaces de captar glutamato en forma activa o si la presencia del aminoácido en las vesículas correspondía a una

difusión de éste desde el citoplasma.

De Belleruche y Bradford (1973) no observaron captación activa de glutamato por vesículas sinápticas ni tampoco glutamato dentro de ellas, por lo que postularon que este compuesto, en su función transmisora, podría liberarse directamente desde el citoplasma al espacio intersináptico.

Lähdesmäki y col. (1977) detectan una acumulación activa de glutamato que se manifiesta sólo a altas concentraciones de Na^+ . Esto sugiere, que la preparación que usan está contaminada con membrana plasmática, ya que la captación dependiente de Na^+ es característica de estas membranas.

Karpinnen y col. (1980) al inyectar ^{14}C -glutamato en cerebro de rata detectan radiactividad en vesículas sinápticas. Ellos describen captación de glutamato por un proceso independiente de ATP pero dependiente de sodio, lo que también podría tener relación con la presencia de fragmentos de membrana plasmática en la preparación.

El trabajo más claro en relación a la captación de glutamato por vesículas sinápticas es el de Naito y col. (1983) quienes obtienen una preparación muy pura de vesículas usando anticuerpos contra la Sinapsina I, una proteína presente en la superficie de ellas. Estas vesículas son capaces de captar glutamato en forma dependiente de ATP y temperatura e independiente de sodio.

En este trabajo de tesis, las vesículas preparadas por el método de Hata, purificadas por filtración en Sefarosa 4B fueron capaces de incorporar glutamato en forma dependiente de ATP y de temperatura. No se observó incorporación en ausencia del nucleótido ni al incubar a temperatura baja.

Esta captación del aminoácido dependiente de ATP e independiente de sodio muestra la funcionalidad de ellas y da mayor peso a los resultados descritos anteriormente.

MECANISMOS IONICOS INVOLUCRADOS EN LA NEUROTOXICIDAD DE LOS AMINOACIDOS EXCITADORES .

A. EFECTO DE AMINOACIDOS ACIDOS SOBRE EL FLUJO DE CALCIO

El kainato, el N-metil-D-aspartato y una gran cantidad de derivados y análogos del glutamato y del aspartato han sido catalogados como compuestos excitotóxicos, ya que al ser aplicados a neuronas centrales de vertebrados producen excitación de ellas y en ciertas condiciones, un efecto tóxico que se traduce en destrucción neuronal (ref. en Coyle, 1983).

La demostración reciente de que los antagonistas de los aminoácidos excitadores previenen el daño celular en los casos de anoxia e isquemia cerebral, es la prueba más directa de que los aminoácidos endógenos liberados en la sinapsis pueden en ciertas condiciones llevar a la destrucción neuronal (Simon y col., 1984).

El mecanismo por el cual los agonistas de los aminoácidos destruyen algunas células no está claro. Se ha postulado que este hecho estaría asociado a la despolarización sostenida de la neurona. No se ha determinado en forma precisa cual es la naturaleza de los cambios de permeabilidad que producen estos compuestos, pero la información existente indica que la activación de los receptores a los que se unen modificaría los flujos de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Mayer y

Westbrook, 1985). El enfoque actual de este problema es, por lo tanto, el estudio de los cambios de estos flujos iónicos y el análisis histológico de tejidos expuestos a la acción de agonistas en presencia y ausencia de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- . Garthwaite y col, 1986; Rothmann, 1985).

En este trabajo de tesis se estudió el efecto de sustancias excitadoras y neurotóxicas tales como kainato, glutamato, homocisteato, N-metil-D,L-aspartato e ibotenato sobre la entrada de calcio a cortes de corteza cerebral de rata.

Todos los compuestos estudiados produjeron un aumento significativo de la captación de calcio.

Al examinar los cortes de tejido empleados, se observó que ellos mostraban un aspecto normal luego de 3 horas de incubación en el medio sin droga, por lo que se descartó que la entrada de calcio fuese inespecífica y se debiera a un fenómeno asociado a daño celular. Esto concuerda con la observación de que la entrada de calcio al tejido alcanza la saturación a los 20 min de incubación.

El compuesto más activo fue el ibotenato, seguido del NMA, el que a su vez fue diez veces más activo que el kainato, glutamato y el homocisteato. La potencia de estas drogas sugiere que en esta preparación de corteza cerebral se estarían activando preferentemente los receptores que unen NMDA, los que son muy abundantes en las capas superficiales de la corteza (Greenamyre y col., 1985).

La potencia de las sustancias ensayadas, en cuanto a su capacidad para estimular la entrada de calcio, se correlaciona con el efecto excitador de ellas al ser aplicadas a cortes de cuerpo estriado,

pero es diferente a la potencia excitatoria y tóxica de los compuestos inyectados en cuerpo estriado, hipotálamo e hipocampo de animales vivos (Biscoe y col., 1976; Nadler y col., 1981; Olney y col., 1971; Schawrcz y col., 1978).

Al interpretar y comparar los resultados de experimentos realizados in vivo e in vitro, es importante considerar la técnica de administración de la sustancia en estudio. La incubación del tejido en un medio que contiene una droga lleva, al cabo de un cierto tiempo, a una distribución homogénea de ella y cada célula estará expuesta a una concentración prácticamente constante y conocida. Esto no ocurre cuando la droga se aplica localmente y hay difusión de ella, en cuyo caso se produce todo un gradiente de concentración desde la zona de aplicación en que esta concentración es máxima. Por otra parte si el tiempo de exposición del tejido frente al compuesto activo es prolongado puede producirse la desensibilización de los receptores o una mayor captación del aminoácido por el sistema de transporte presináptico.

Si bien el receptor de NMDA une aspartato y glutamato con mayor afinidad que ibotenato, la gran potencia de este compuesto y la del NMDA puede deberse a que ambos son transportados a baja velocidad desde el compartimiento extracelular y no se unen a los sistemas de captación presináptica que transportan con alta velocidad al glutamato y al aspartato (Fagg y col., 1986).

Se ensayó también el efecto de N-acetilaspártato y α -metilaspártato sobre el flujo de calcio. Ambos compuestos son constituyentes normales en el cerebro de varias especies de mamíferos y se desconoce cuales pueden ser sus funciones. La distribución regional del

N-acetilaspartato es semejante a la del aspartato en cerebro de rata y su concentración es de 5,18 umoles por gramo de tejido húmedo en cerebro de caballo, concentración bastante alta en relación a la de otros aminoácidos. El N-acetilaspartato y el α -metil-aspartato, que no poseen actividad neurotóxica, no modificaron el flujo de calcio.

Este trabajo muestra que el efecto del glutamato y de sus análogos estructurales sobre el aumento de la captación de Ca^{2+} es más general que lo que se pensó inicialmente y podría constituir el evento unificador de la acción neurotóxica de los compuestos excitadores.

Ya que en cerebro se han descrito proteasas dependientes de calcio (CANP), las cuales intervienen en la degradación de proteínas del citoesqueleto y también en la degradación de neuropéptidos (Pontremoli y Melloni, 1986) y de acuerdo con antecedentes que relacionan el fenómeno de toxicidad y muerte celular en el hígado, riñón y corazón con un aumento en el contenido de calcio intracelular, se postula que el aumento del Ca^{2+} intracelular libre podría activar proteasas dependientes de calcio las que llevarían a la destrucción de la estructura neuronal.

Coyle (1983), ha postulado que los aminoácidos ácidos y sus análogos producirían efectos excitadores y neurotóxicos directos cuando actúan sobre receptores postsinápticos. La acción de ellos sobre los receptores presinápticos se traduciría en un aumento de la entrada de Ca^{2+} al terminal, favoreciendo la liberación del neurotransmisor excitador endógeno, el que reforzaría el efecto postsináptico del aminoácido aplicado desde el exterior. La acción conjunta

del compuesto exógeno y del transmisor liberado en la sinapsis produciría una gran depolarización con gran consumo de energía. Esto conduciría finalmente al agotamiento de las reservas energéticas y a un aumento masivo de la entrada de Ca^{2+} , activándose proteasas y fosfolipasas dependientes de calcio cuya acción conduciría a la muerte celular.

Retz y col. (1981), midieron la captación de calcio por sinaptosomas en presencia de kainato 1mM y no observaron variaciones de ella en relación al experimento realizado sin kainato. Esto puede explicarse porque los receptores para las sustancias excitadoras están ubicados casi exclusivamente en los cuerpos neuronales y en las dendritas y no en los axones.

Garthwaite y Garthwaite (1986) y Hori y col. (1985), han demostrado que los agonistas de los aminoácidos excitadores aumentan la concentración de calcio intracelular en cortes de corteza piriforme de rata y en cortes de cerebelo de rata inmadura, produciendo un daño celular característico. En neuronas de hipocampo en cultivo y en retina de pollo, en cambio, se ha observado que las alteraciones histológicas estarían relacionadas con la entrada de Na^+ y de Cl^- a la célula (Rothman, 1985; Hori y col., 1985).

La aparente discrepancia entre estos trabajos reside en el tipo de lesión considerada en ambos casos, como lo muestra un estudio realizado recientemente en nuestro laboratorio. Al incubar cortes de corteza cerebral con kainato se inducen dos tipos de lesión: una que deriva del hinchamiento de los cuerpos neuronales y dendritas y otra

que se manifiesta por la aparición de neuronas picnóticas. El hinchamiento de la célula y posterior lisis de ella estarían relacionados con la entrada de Na^+ , Cl^- y agua, en cambio la condensación picnótica sería dependiente del Ca^{2+} (Berdichevsky y col., 1987).

La importancia de este estudio es que el tipo de lesión picnótica por aumento de Ca^{2+} es semejante al que se observa en una serie de patologías cerebrales y al proceso degenerativo consecuente a la actividad convulsivante inducida experimentalmente.

B. CARACTERIZACION DEL CANAL INVOLUCRADO .

La entrada de calcio provocada por los aminoácidos excitadores podría estar mediada por un canal asociado al receptor mismo o bien a canales dependientes de voltaje.

La caracterización preliminar del tipo de canal involucrado en la activación del receptor para NMA se realizó incubando el tejido en presencia del aminoácido y de inhibidores de canales de calcio como Cd^{2+} , Co^{2+} y nifedipina. La captación de calcio aumentada por NMA fue inhibida por Co^{2+} y Cd^{2+} , pero no se vio afectada por la nifedipina. Se observó un aumento de la entrada de calcio cuando se aplicó nifedipina en ausencia de NMA.

Dado el gran número de receptores para dihidropiridinas presentes en regiones sinápticas del cerebro de mamíferos (Marangos y col., 1982), el hallazgo del efecto de la droga sobre la captación de calcio en ausencia de NMA, pudiera ser indicativo del posible papel fisiológico de estos compuestos. La apertura de canales de calcio cuando se usa nifedipina sola podría corresponder a un efecto agonista de ella sobre algún tipo de canal de calcio, como se ha observado que

ocurre en corazón cuando se usan concentraciones bajas de la droga (Hess et al., 1984).

Se han descrito tres tipos de canales de calcio en neuronas sensoriales de ganglio de raíz dorsal de embrión de pollo (Nowycky y col., 1985), uno de los cuales es sensible a dihidropiridinas y poco sensible al Cd^{2+} . Este canal denominado de tipo L, que se abre por un tiempo prolongado y permite un gran paso de corriente, es muy abundante en tejido muscular y cardíaco. Los otros dos tipos de canales, N y T, tienen un tiempo de apertura más corto, son sensibles al Cd^{2+} e insensibles a dihidropiridinas. Estos últimos canales al parecer están en mayor proporción en el tejido nervioso que, por su función, no requeriría de tiempos de apertura tan prolongados como el tejido muscular y cardíaco. El canal de calcio estimulado por NMA es insensible a dihidropiridinas y podría corresponder a uno de estos dos tipos.

Se ha descrito que la nitrendipina, otra dihidropiridina, en concentraciones entre 0,1 nM y 10 μM no tiene efecto sobre la captación de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ en sinaptosomas despolarizados con KCl (Daniell y col., 1983), lo mismo se ha observado en relación al efecto de nifedipina 30 μM (Nachsen y Blaustein, 1979). Luego, si estas drogas tuviesen efecto sobre la entrada de calcio producida por excitación neuronal, su potencia es menor en el tejido nervioso que en el muscular.

Los resultados que muestran que la TTX no inhibe la captación de calcio estimulado por NMA indicarían que la apertura de estos canales de calcio no es consecuencia de la despolarización producida por la entrada de sodio a través de canales sensibles a voltaje, bloqueables por TTX. En corteza sensorial motora de gato, se ha observado

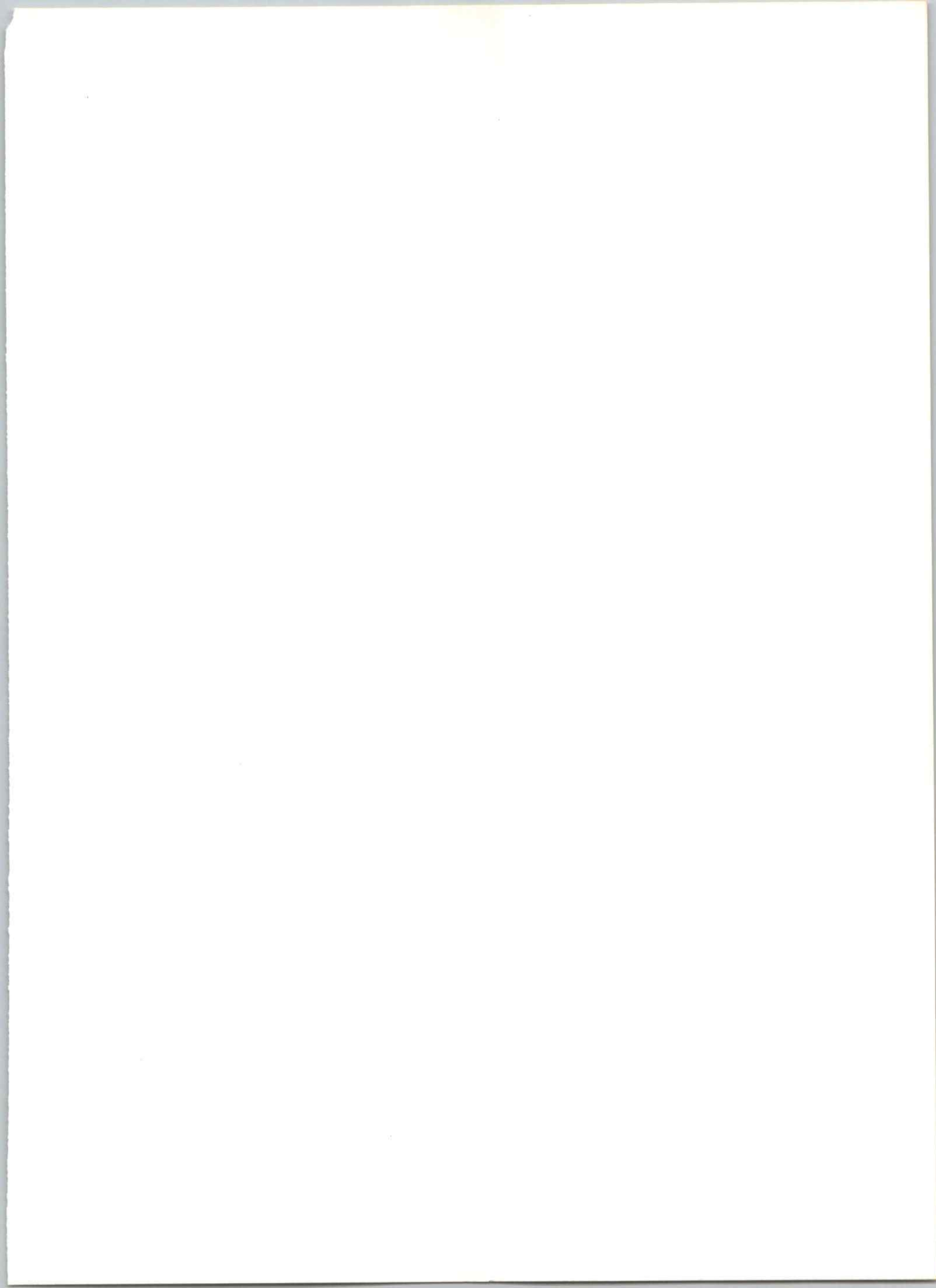
que la aplicación iontoforética de glutamato, aspartato y homocisteato provocan un cambio en el flujo de Ca^{2+} que tampoco es afectado por TTX (Heinemann y Pumain, 1981). La TTX no interfiere con la despolarización postsináptica, pero previene la generación y propagación del potencial de acción dependiente de Na^+ , sin afectar los canales de Ca^{2+} .

Estos experimentos sugieren que gran cantidad del calcio que entra al espacio intracelular lo haría por canales localizados en la zona postsináptica.

Los estudios que existen en relación al mecanismo iónico involucrado en la activación del receptor para NMA muestran que este es diferente al que opera para KA y QA. Los canales asociados al receptor de NMA son bloqueados selectivamente por el Mg^{2+} cuya afinidad por el receptor depende del campo eléctrico. Mayer y Westbrook (1985) han postulado que el Mg^{2+} entra y bloquea los canales abiertos por el NMA sin interferir con la unión del aminoácido. A la concentración fisiológica de Mg^{2+} usada en estos experimentos, el canal asociado al receptor no sería permeable a Ca^{2+} y el efecto de aumento del calcio intracelular estaría dado por el paso del catión a través de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (Nowak, 1984).

C. EFECTO DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS DEL SNC SOBRE LOS FLUJOS DE CALCIO.

El hallazgo que el GABA por sí solo aumenta la captación de calcio e inhibe el incremento producido por estimulación del tejido con NMA podría interpretarse a la luz de los datos que indican que este compuesto es capaz de despolarizar neuronas en muchas preparaciones



in vitro. En neuronas simpáticas de rata la aplicación de GABA induce una despolarización por disminución de la concentración interna de K^+ y Cl^- , sin afectar la concentración interna de Na^+ (Ballanyi y col., 1984). En neuronas de hipocampo el GABA hiperpolariza el soma y despolariza las dendritas donde supuestamente hay mayor número de receptores de NMA (Alger y Nicoll, 1982 y Anderson y col, 1980).

Es probable que la despolarización mediada por GABA active parcialmente canales de calcio dependientes de voltaje. Como la despolarización se debería a una conductancia aumentada para cloruro, el potencial de membrana se fijaría en el potencial de equilibrio del Cl^- y el efecto despolarizante del NMA sería incapaz de sobrepasar este potencial fijo. La magnitud de los canales de calcio activados por NMA no podría ser cuantitativamente mayor que la permitida por la despolarización producida por el GABA. Un efecto semejante al descrito se ha observado en células de hipófisis intermedia de rata (Tomiko y col., 1983; Taraskevich y Douglas, 1982).

Si bien los experimentos de esta tesis no se hicieron en condiciones de potencial fijo, el efecto observado luego de la aplicación de GABA, en que aparentemente se fijaría el potencial de membrana en el potencial de equilibrio del Cl^- , indica que gran parte del calcio que entra a la célula en presencia de NMA lo haría por canales de calcio sensibles a voltaje.

Los experimentos realizados en presencia de NMA y adenosina muestran que el efecto inhibitor del nucleósido en neuronas corticales no estaría mediado por el mecanismo de entrada de calcio a través del cual actúan los aminoácidos excitadores.

D. EFECTO DE SUSTANCIAS DEPRESORAS DEL SNC SOBRE LOS FLUJOS DE CALCIO.

Los antecedentes bibliográficos que señalan que el etanol, el pentobarbital y la morfina disminuyen el contenido de calcio intracelular en diferentes regiones del cerebro (Ross, 1976) e inhiben la captación de calcio en terminales nerviosos (Blaustein y Ector, 1975; Harris y Hood, 1980; West y Miller, 1983) indujo a estudiar el efecto de estas drogas sobre la entrada de calcio estimulada por NMA .

De los compuestos ensayados: etanol, pentobarbital y morfina, ninguno modificó el efecto de NMA sobre la entrada de calcio. El etanol tampoco tuvo efecto sobre el flujo de calcio aumentado por acción de glutamato ni de kainato.

Estos resultados indican que los efectos de estos compuestos sobre los flujos de calcio estarían mediados por un mecanismo diferente al que opera cuando se aplican aminoácidos excitadores o sus análogos.

CONCLUSIONES GENERALES

1. El ácido N-acetilaspartilglutámico, postulado como neurotransmisor, no posee efecto excitador sobre el SNC y no potencia ni antagoniza el efecto del L-glutamato, in vivo e in vitro. Este compuesto es susceptible de ser hidrolizado por peptidasas endógenas, generando glutamato.

Los efectos excitadores y convulsivantes descritos para el NAAG, derivarían del glutamato liberado enzimáticamente.

2. El único componente endógeno activo presente en vesículas sinápticas de corteza cerebral y otras regiones del cerebro de rata, que se une al receptor de kainato, es el ácido glutámico.

La alta concentración del aminoácido en las vesículas apoya fuertemente su posible papel como neurotransmisor excitador en el SNC.

3. Las sustancias excitadoras y neurotóxicas, kainato, glutamato, homocisteato, N-metil-D,L-aspartato e ibotenato producen un aumento significativo de la captación de calcio en cortes de corteza cerebral de rata. El N-acetil-aspartato y α -metil-aspartato que no tienen efecto neurotóxico no modifican este flujo iónico.

El aumento de la captación de Ca^{2+} podría constituir el evento unificador de la acción neurotóxica de estos compuestos excitadores ya que el aumento de la concentración de calcio libre intracelular podría activar proteasas y fosfolipasas dependientes del ión y llevar a la destrucción de la estructura celular.

4. Los aminoácidos excitadores activarían canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, que son bloqueados por Co^{2+} y Cd^{2+} pero que no son afectados por nifedipina .

5. En el efecto del etanol, pentobarbital, morfina y adenosina sobre los flujos de calcio no está involucrado el mecanismo que opera en la acción excitadora de los aminoácidos ácidos y sus derivados.

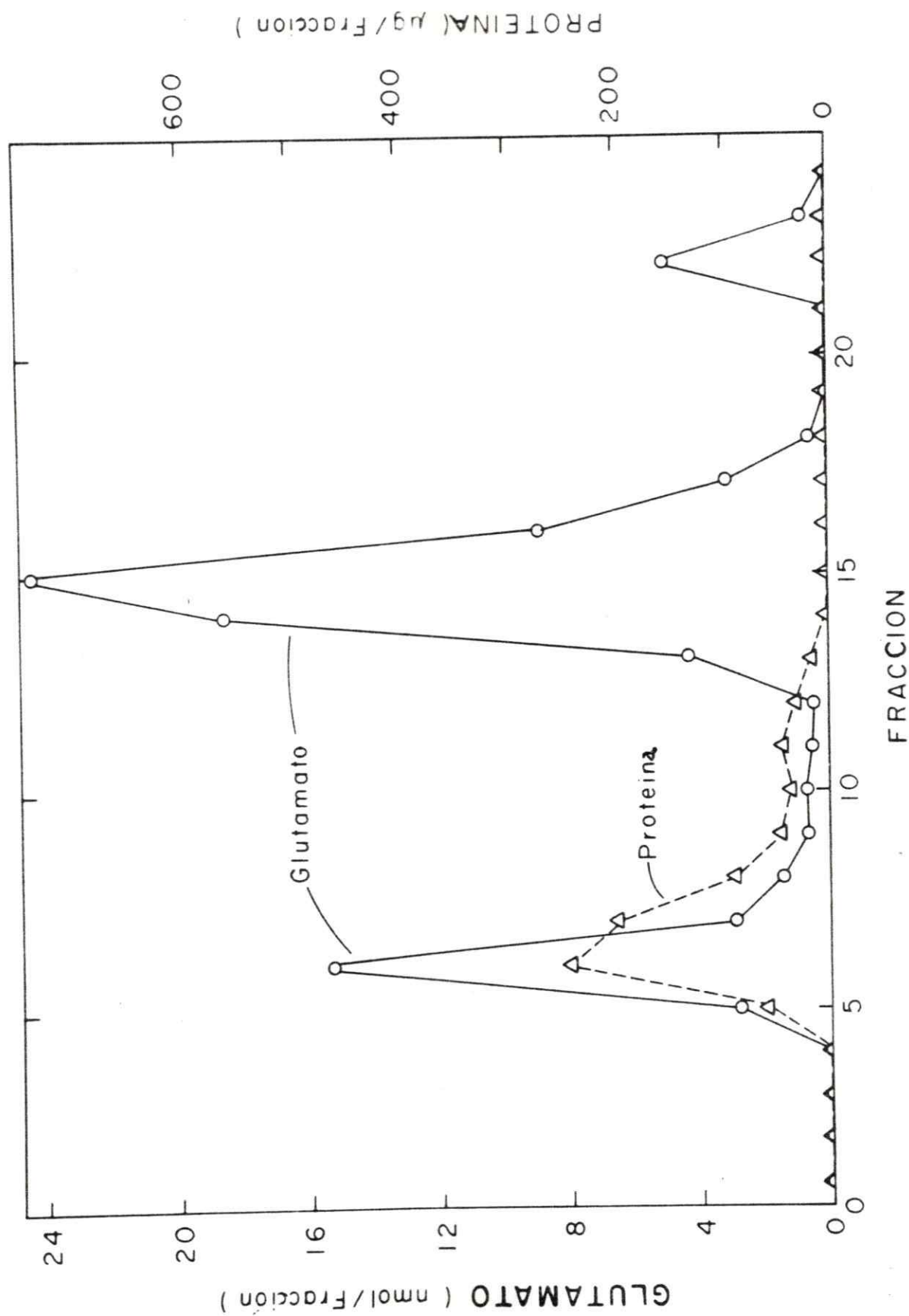


Figura 25. CONTENIDO DE GLUTAMATO EN VESICULAS SINAPTICAS PURIFICADAS
 Leyenda en la página siguiente.

Figura 25. CONTENIDO DE GLUTAMATO EN VESICULAS SINAPTICAS PURIFICADAS
Las vesículas se prepararon de acuerdo al método de Kadota y Kadota (1973) modificado. La fracción donde aparece las vesículas sinápticas (pico en fracción 6) contiene 15,31 nmoles de glutamato y 240 ug de proteína. Las condiciones experimentales se señalan en Riveros y col. (1986).

CONTENIDO DE GLUTAMATO EN VESICULAS SINAPTICAS (*)

1.- Radio de una VS esferica	250 Å°
2.- Area superficial ($4 \bar{I}r^2$)	
3.- Area de la bicapa lipídica ($8 \bar{I}r^2$)	1.571.250 Å ²
4.- Area de una molécula de fosfolípido (33 mN m^{-1} ; $t^{\circ} > T_m$)	55 Å ²
5.- Número de moléculas de fosfolípidos en cada VS (3:4)	28.658
6.- Peso molecular promedio de los lípidos de VS	820,75
7.- Peso de 28.568 moléculas de fosfolípidos	$3,89 \times 10^{-17}$ g
8.- Razón fosfolípidos / proteínas en VS	1,44
9.- Contenido de proteína por VS (7:8)	$2,7 \times 10^{-17}$ g
10.- Pico de la fracción de VS eluída de Sefarosa 4B (15,31 nmoles de glutamato)	$9,22 \times 10^{15}$ molec
11.- Pico de la fracción de VS = 240 µg proteína Pureza de la preparación 95% = 228 µg	$8,44 \times 10^{12}$ VS
12.- Número de moléculas / VS (10:11)	1092 molec. de glu /VS
13.- Si un 30% de las VS fuesen glutamatérgicas	3640 molec / VS
14.- Volumen interno de una VS esférica pequeña de radio interno = 190 Å°	$2,87 \times 10^7$ Å ³

LA CONCENTRACION DE GLUTAMATO EN VESICULAS SINAPTICAS DE CORTEZA
CEREBRAL DE RATA SERIA DE 0,21M.

(*) Datos en Riveros y col., 1986.

BIBLIOGRAFIA

- Alger, B. E. y Nicoll, R. A. (1982). Pharmacological evidence for two kinds of GABA receptors on rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 328, 125-141.
- Åkerman, K. y Nicholls, D. (1983). Ca^{2+} transport and the regulation of transmitter release in isolated nerve endings. *Trends Biochem. Sci.* 8, 63-64.
- Anderson, P., Dingledine, R., Gjerstad, L. Langmoen, I. y Mosfeldt Laursen, A. (1980). Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-amino butiric acid. *J. Physiol., (Lond.)* 305, 279-296.
- Auker, C. R., Braitman, D. J. y Rubinstein, S.L. (1982). Electrophysiological action of kainic acid and folates in the in vitro olfactory cortex slice. *Nature* 297, 583-584.
- Balcar, V. J. y Johnston G. A. R. (1972). Structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *J. Neurochem.* 19, 2657-2666.
- Ballanyi, K., Grafe, P., Reddy, M. y ten Bruggencate, G. (1984). Different types of potassium transport linked to carbachol and -amino butiric acid actions in rat sympathetic neurons. *Neuroscience* 12, 917-927.
- Barker, J. L. y Gainer, H. (1973). Pentobarbital: selective depression of excitatory postsynaptic potentials. *Science* 182, 720-722.
- Baud, J. y Fagg G. (1986). Glutamate containing dipeptides do not modulate ligand binding at excitatory aminoacid receptors. *Neurosci. Lett.* 70, 228-233.
- Baudry, M. y Lynch, G. (1981). Characterization of two 3H - glutamate binding sites in rat hippocampal membranes. *J. Neurochem.* 36, 811-820.
- Benjamin, A.M. y Quastel, J.H. (1972). Locations of aminoacids in brain slices from the rat. *Biochemistry* 128, 631-646.
- Berdichevsky, E., Riveros, N., Sánchez Armáñs y Orrego, F. (1983). Kainate, N-methyl aspartate and other excitatory aminoacids increase calcium influx into rat brain cortex cells, in vitro. *Neurosci. Lett.* 36, 75-80.

- Berdichevsky, E., Muñoz, C., Riveros, N., Cartier, L. y Orrego, F. (1987). Neuropathological changes in the rat brain cortex in vitro: Effect of kainic acid and of ion substitution. *Brain Res.* 423, 213-220.
- Biscoe, J.L., Evans, R.H., Headley, P.M., Martin, M. y Watkins, J.C. (1976). Structure activity relations of excitatory aminoacids on frog and rat spinal neurons. *Br. J. Pharmac.* 58, 573-582.
- Biziere, K. y Coyle, J. T. (1978). Effects of kainic acid on ion distribution and ATP levels of striatal slices incubated in vitro. *J. Neurochem.* 31, 513-520.
- Blakely, R. D., Ory Lavollee, L., Thompson, R. C. y Coyle, J. T. (1986). Synaptosomal transport of radiolabel from N-acetyl aspartyl-³H- glutamate suggests a mechanism of inactivation of an excitatory neuropeptide. *J. Neurochem.* 47, 1013-1019.
- Blaustein, M. P. y Ector, A. C. (1975). Barbiturate inhibition of calcium uptake by depolarized nerve terminals, in vitro. *Mol. Pharmacol.* 11, 369-378.
- Bradford, H. F., Mc Ilwain, H. (1966). Ionic basis for the depolarization of cerebral tissues by excitatory acidic aminoacids. *J. Neurochem.* 13, 1163-1167.
- Burt, D. (1978). Criteria for receptor identification in neurotransmitter receptor binding. Ed. Yamamura H. I. Raven Press. N.Y., 42-54.
- Campochiaro, P. y Coyle J. T. (1978). Ontogenetic development of kainate neurotoxicity correlates with glutamatergic innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2025-2029.
- Collins, G. G. S. y Probett, G. A. (1981). Aspartate and not glutamate is the likely transmitter of the rat lateral olfactory tract fibers. *Brain. Res.* 209, 231-234.
- Cooke, W. J. y Robinson, J. D. (1971). Factors influencing calcium movements in rat brain slices. *Amer. J. Physiol.* 221, 218-225.
- Cooper, J. y Meyer, E. (1984). Possible mechanisms involved in the release and modulation of release of neuroactive agents. *Neurochem. International* 6, 419-433.
- Coyle, J. T. (1983). Neurotoxic action of kainic acid. *J. Neurochem.* 41, 1-11.
- Curatolo, A., D' Arcangelo, P., Lino, A. y Brancati, A. (1965). Distribution of N-acetyl aspartic and N-acetyl-aspartyl-glutamic acids in nervous tissue. *J. Neurochem.* 12, 339-342.

Curtis, D. R. y Johnston G. A. R. (1974). Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergebn. Physiol.* 69, 94-188.

Curtis, D. R. y Watkins, J. C. (1960). The excitation and depression of spinal neurons by structurally related aminoacids. *J. Neurochem.* 6, 117-141.

Curtis, D. R., Phillis, J. W. y Watkins, J. C. (1959). The chemical excitation of spinal neurons. *Nature (Lond)* 183, 611-612.

Daniell, L. Barr, E. y Leslie, S. (1983). Calcium uptake into whole brain synaptosomes unaltered by dihydropyridine calcium antagonists. *J. Neurochem.* 41, 1455-1459.

De Belleruche, J. S. y Bradford, H. F. (1973). Amino acids in synaptic vesicles from mammalian cerebral cortex: a reappraisal. *J. Neurochem.* 21, 441-451.

De Belleruche, J. S. y Bradford, H. F. (1977). On the site of origin of transmitter amino acids released by depolarization of nerve terminal *in vitro*. *J. Neurochem.* 29, 335-343.

De Feudis, F. V. (1975). Amino acids as central neurotransmitters. *Ann. Rev. Pharmacol.* 15, 105-130.

Di Lauro, A., Meek, J. L. y Costa, E. (1982) Specific high affinity binding of L- (³H)-aspartate to rat brain membranes. *J. Neurochem.* 38, 1261-1267.

Dolphin, A. C. (1983). The adenosine agonist 2-cloroadenosine inhibits the induction of long term potentiation of the perforant path. *Neurosci. Lett.* 39, 83-89.

Douglas, W. W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br. J. Pharmac.* 34, 451-474.

Duce, R., Donaldson, P. L. y Usherwood, P. N. R. (1983). Investigation into the mechanism of excitant amino acid cytotoxicity using a well characterized glutamatergic system. *Brain Res.* 263, 77-87.

Dunant, Y. y Israel, M. (1979). When the vesicular hypothesis is no longer the vesicular hypothesis. *Trends Neurosci.* 2, 130-132.

Elrod, S. y Leslie, S. (1980). Acute and chronic effect of barbiturates on depolarization induced calcium influx into synaptosomes from rat brain regions. *J. Pharm. exp. Ther.*, 212, 131-136.

Enna, S.J. (1980). Basic receptor methods I. Receptor Binding Techniques. Society of Neuroscience. Cincinnati, Ohio, U.S.A.

- Fagg, G. E. y Foster, A. C. (1983). Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 9, 701-719.
- Fagg, G. E. y Lane, J. D. (1980). The uptake and release of putative aminoacid neurotransmitters. En *Commentaries in the neuroscience*. Ed. A.D. Smith, R. Llinas, P. Kostyuk. Pergamon Press, 183-204.
- Fagg, G. E., Foster, A. C. y Ganong, A. (1986). Excitatory amino acid synaptic mechanisms and neurological function. *Trends Pharmacol. Sci.* 7, 357-363.
- Fagni, L., Baudry, M. y Lynch, G. (1983a). Desensitization to glutamate does not affect synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 261, 167-171.
- Fagni, L., Baudry, M. y Lynch, G. (1983b). Classification and properties of acidic aminoacid receptor in hippocampus. *J. Neurosci.* 3, 1538-1546.
- Farber, J. L. (1981). The role of calcium in cell death. *Life Sci.* 29, 1289-1295.
- Ferkany, J. y Coyle, J. (1983). Evoked release of aspartate and glutamate: disparities between prelabeling and direct measurement. *Brain Res.* 278, 279-282.
- Ferkany, J., Zaczek, R. y Coyle, J. (1982). Kainic acid stimulates excitatory aminoacid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature (Lond.)* 298, 757-759.
- Ffrench-Muller, J. M., Koller, K., Zaczek, R., Coyle, J., Hori N. y Carpenter, D. O. (1985). N-acetyl aspartyl glutamate: Possible role as the neurotransmitter of the lateral olfactory tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 3897-3900.
- Florin, M., Stotz, E.H. (eds) (1964). *Comprehensive Biochemistry*, Vol 13, Elsevier N.Y.
- Foster, A. C. y Fagg, G. E. (1984). Acidic aminoacid binding sites in mammalian neuronal membranes. Their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Res. Review* 7, 103-164.
- Foster, A. C. y Roberts, P. J. (1978). High affinity L-³H-glutamate binding to postsynaptic receptor sites on rat cerebellar membranes. *J. Neurochem.* 31, 1467-1477.
- Foster, A. C., Fagg, G. E., Mena, E. E. y Cotman, C. W. (1981). L-glutamate and L-aspartate bind to separate sites in rat brain synaptic membranes. *Brain Res.* 229, 246-250.

- Fredholm, B. y Hedqvist, P. (1980). Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides. *Biochem. Pharmac.* 29, 1635-1643.
- Garthwaite, G. y Garthwaite, J. (1986). Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slices: Dependence on calcium concentration. *Neurosci. Lett.* 66, 193-198.
- Garthwaite, J. y Wilkin, G. P. (1982). Kainic acid receptors and neurotoxicity in adult and immature rat cerebellar slices. *Neuroscience* 7, 2499-2514.
- Garthwaite, G., Hajos, F. y Garthwaite, J. (1986). Ionic requirements for neurotoxic effect of excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 18, 437-447.
- Graham, L. T. Shank, R. P., Werman, R. y Aprison, M. H. (1967). Distribution of some synaptic transmitter suspects in cat spinal cord: glutamic acid, aspartic acid, γ -aminobutyric acid, glycine and glutamine. *J. Neurochem.* 14, 465-472.
- Greenamyre, J. T., Olson, J. M., Penney, J. y Young, A. (1985). Autoradiographic characterization of N-methyl-D-aspartate, quisqualate and kainate sensitive glutamate binding sites. *J. Pharmac. exp. Ther.* 233, 254-263.
- Griffiths, T., Evans, M. C. y Meldrum, B. S. (19) Status epilepticus: The reversibility of calcium loading and acute neuronal pathological changes in rat hippocampus. *Neuroscience.* 12, 557-567.
- Hall, J. G., Hicks, T. P. y Mc Lennan, H. (1978) Kainic acid and the glutamate receptor. *Neurosci. Lett.* 8, 171-175.
- Halliwel, J. V. y Scholfield, N. (1984) Somatically recorded Ca- currents in guinea pig hippocampal and olfactory cortex neurons are resistant to adenosine action. *Neurosci. Lett.* 50, 13-18.
- Harris, R. A., y Hood, W. F. (1980) Inhibition of synaptosomal calcium uptake by ethanol. *J. Pharmac. exp. Ther.* 213, 562-568.
- Harris, R. A. y Stokes, J. A. (1982). Effects of a sedative and a convulsant barbiturate on synaptosomal calcium transport. *Brain Res.* 242, 157-163.
- Harvey, J. A. y Mc Ilwain, H. (1968). Excitatory acidic amino acids and the cation content and sodium ion flux of isolated tissue from the brain. *Biochem. J.* 108, 269-274.
- Hata, F., Kuo, C., Matsuda, T. y Yoshida, H. (1976). Factors required for Ca-sensitive acetylcholine release from crude synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 27, 139-144.

Heinemann, U. y Pumain, R. (1981). Extracellular calcium activity changes in cat sensorimotor cortex induce by iontophoretic application of aminoacids. *Exp. Brain Res.* 40, 247-250.

Henn, F. A., Anderson, D. J. y Rustad, D. G. (1976). Glial contamination of synaptosomal fractions. *Brain Res.* 101, 341-344.

Henn, F. A., Goldstein, M. N. y Hamberger, A. (1974). Uptake of the neurotransmitter candidate glutamate by glia. *Nature (Lond)*. 249, 663-664.

Herndon, R. M., Coyle, J. T. y Addicks, E. (1980). Ultrastructural analysis of kainic acid lesion to cerebellar cortex. *Neuroscience* 5, 1015-1026.

Hertz, L. (1979). Funtional interactions between neurons and astrocytes-I turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog. Brain Res.* 13, 277-323.

Hess, P., Lansman, J. y Tsien, R. N. (1984). Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropiridine Ca agonists and antagonists. *Nature (Lond)* 311, 538-544.

Hori, N., Ffrench-Muller, J. y Carpenter, D. (1985). Kainic acid responses and toxicity show pronounced Ca^{2+} dependence. *Brain Res.* 358, 380-384.

Jasper, H. H. y Ajmone-Marsan, C. (1954). *Stereotaxic Atlas of the Diencephalon of the Cat*. National Research Council of Canada, Ottawa.

Johnson, J. L. (1978). The excitant aminoacids glutamic and aspartic acid as transmitter candidates in the vertebrate central nervous system. *Progr. in Neurobiol.* 10, 155-202.

Johnson, J. L. y Aprison, M. H. (1971). The distribution of glutamate and total free amino acids in thirteen specific regions of the cat central nervous system. *Brain Res.* 26, 141-148.

Kadota, K. y Kadota, T. (1973). Isolation of coated vesicles, plain synaptic vesicles and flocculent material from a crude synaptosome fraction of guinea pig whole brain. *J. Cell Biol.* 58, 135-151.

Karpinnen, A. y Lähdesmäki, P. (1979). Uptake of glutamate into synaptic vesicles:dependence of vesicle treatment, ions, temperature and energy supply. *Cell. Mol. Biol.* 25, 195-202.

Karppinen, A., Kumpulainen, E. y Lähdesmäki, P. (1980). Comparative studies on the interaction of amino acids with synaptosomes, synaptic vesicles and synaptic membranes. *Cell. Mol. Biol.* 25, 335-343.

Katz, B. y Miledi, R. (1967). A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J. Physiol. (Lond.)* 192, 407-436.

Koller, K. y Coyle, J. T. (1984a). Characterization of the interactions of N-acetylaspartyl-glutamate with ^3H -L-glutamate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 98, 193-199

Koller, K. y Coyle, J. T. (1985). The characterization of the specific binding of ^3H -N-acetylaspartylglutamate to rat brain membranes. *J. Neurosci.* 5, 2882-2888.

Kontro, P., Marnela, K. y Oja, S.S. (1980). Free amino acids in the synaptosome and synaptic vesicle fractions of different bovine brain areas. *Brain Res.* 184, 129-141.

Korf, J. y Postema, F. (1984). Regional calcium accumulation and cation shifts in rat brain by kainate. *J. Neurochem.* 43, 1052-1060.

Krnjević, K., (1974). Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.* 54, 418-540.

Krnjević, K., Morris, M.E. y Reiffenstein, R.J. (1980). Changes in extracellular Ca^{2+} and K^+ activity accompanying hippocampal discharges. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58, 579-583.

Kuriyama, K. Roberts, E. y Kakefuda, T. (1968) Association of the γ -aminobutyric acid system with a synaptic vesicle fraction from mouse brain, *Brain Res.* 8, 132-152.

Kvamme, E. y Lenda, K. (1981) Evidence for compartmentalization of glutamate in rat brain synaptosomes using the glutamate sensitivity of phosphate-activated glutaminase as a functional test. *Neurosci. Lett.*, 25, 193-198.

Lähdesmäki, P. y Winter, P. (1977) A peptide containing aspartic acid, glutamic acid and serine in calf brain synaptic vesicles. *Acta Chemica Scandinavica*, B 31, 802-806.

Lähdesmäki, P., Karppinen, A., Saarni, H. y Winter, R. (1977) Amino acids in the synaptic vesicle fraction from calf brain: content, uptake and metabolism. *Brain Res.* 138, 295-308.

Lassmann, H., Petsche, U., Kitz, K., Baran, H., Sperk, G., Seitelberger, F. y Hornykiewicz, O. (1984) The role of brain edema in epileptic brain damage induced by systemic kainic acid and injection. *Neuroscience* 13, 691-704

Levi, G. y Raiteri, M. (1973) Detectability of high and low affinity uptake systems for GABA and glutamate in rat brain slices and synaptosomes. *Life Sci.* 121, 81-88.

- Logan, W. J. y Snyder, S. H. (1972). High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous system. *Brain Res.* 42, 413-431.
- London, E. y Coyle, J.T. (1979) Specific binding of ^3H -kainic acid to receptors sites in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 15, 492-505.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall. R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Luini, A., Goldberg, O. y Teichberg, V. (1981). Distinct pharmacological properties of excitatory amino acid receptors in the rat striatum : study by Na^+ efflux assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 3250-3254.
- Llinás, R. y Nicholson, C. (1975). Calcium role in depolarization-secretion coupling: an aequorin study in squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 187-190.
- Mangan, J. L. y Whittaker, V. P. (1966). The distribution of free amino acids in subcellular fractions of guinea pig brain. *Biochem. J.* 98, 128-137.
- Marangos, P. J., Patel, J., Miller, C. y Marlino, A. M. (1982). Specific calcium antagonist binding sites in brain. *Life Sci.* 31, 1575-1785.
- Marciani, M. G., Louvel, J. y Heinemann, U. (1982). Aspartate induced changes in extracellular free calcium in *in vitro* hippocampal slices of rats. *Brain Res.* 238, 272-277.
- Mayer, M. y Westbrook, G. (1985). The action of N-methyl-D-aspartic acid on mouse spinal neurones in culture. *J. Physiol.* 361, 65-90.
- Mayer, J., Khanna, J. M. y Kalant, H. (1980). A role calcium in the acute and chronic action of ethanol *in vitro*. *Eur. J. Pharmac.* 68, 223-227.
- Mc Geer, E. G. y Mc Geer, P. L. (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature (Lond)* 263, 517-519.
- Mc Geer, E. G., Mc Geer P.L. y Singh, K. (1978). Kainate induced degeneration of neostriatal neurons: dependency upon corticostriatal tract. *Brain Res.* 139, 381-383.
- Mc Ilwain, H. y Rodnight, R. (1962). *Practical neurochemistry*. J. A. Churchill, London. 296.

- Mc Laughlin, B.J., Wood, J. G., Saito, K., Barker, R. y Wu, J. Y. (1974). The fine structural localization of glutamate decarboxylase in synaptic terminals of rodent cerebellum. *Brain Res.* 76, 377-391.
- Mc Lennan, H. (1982). Methyltetrahydrofolate as an antagonist of excitatory amino acids on spinal neurons. *European J. of Pharmac.* 79, 307-310.
- Michaelis, E. K., Michaelis, M. L. y Boyarsky, L. L. (1974). High affinity glutamic acid binding to brain synaptic membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 367, 338-348.
- Michaelis, E., Michaelis, M. y Grubbs, R. (1980). Distinguishing characteristics between glutamate and kainic acid binding sites in brain synaptic membranes. *FEBS. Lett.* 118, 55-57.
- Miller, R.J. y Freedman, S. B. (1984). Are dihydropyridine binding sites voltage sensitive calcium channels? *Life Sci.* 34, 1205-1221.
- Miyake, M., Kohimoto, Y. y Sorimachi, M. (1981). A gas chromatographic method for the determination of N-acetyl-L-aspartic acid, N-acetyl- α -aspartyl glutamic acid and β -citryl-L-glutamic acid and their distributions in the brain and other organs of various species of animals. *J. Neurochem.* 36, 804-801.
- Miyamoto, E. y Tsujio, T. (1967). Determination of N-acetyl- α -aspartyl glutamic acid in the nervous tissue of mammals. *J. Neurochem.* 14, 899-903.
- Miyamoto, E., Kahimoto, Y. y Sano, I. (1966). Identification of N-acetyl- α -aspartyl glutamic acid in the bovine brain. *J. Neurochem.* 13, 999-1003.
- Monaghan, D. T., Holets, V., Toy, D. W. y Cotman, C. (1983). Anatomical distributions of four pharmacologically distinct ^3H -L-glutamate binding sites. *Nature (Lond.)* 306, 176-179.
- Nachsen, D. A. y Blaustein, M. P. (1979). The effects of some organic calcium antagonists on calcium influx into presynaptic nerve terminals. *Mol. Pharmacol.* 16, 579-586.
- Nadler, J. V. (1979). Kainic acid neurophysiological and neurotoxic actions. *Life Sci.* 24, 289-300.
- Nadler, J. V. (1981). Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci.* 29, 2031-2042.
- Nadler, J. V. y Cuthbertson, G. J. (1980). Kainic acid neurotoxicity toward hippocampal formation: dependence on specific excitatory pathways. *Brain Res.* 195, 47-56.

- Nadler, J. V., Evenson, D. A. y Cuthbertson, G. J. (1981). Comparative toxicity of kainic acid and other acidic aminoacids toward rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 6, 2505-2517.
- Nadler, J. V., Perry, B. N. y Cotman, C. W. (1978). Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature (Lond.)* 271, 676-677.
- Naito, S. y Ueda, T. (1983). Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 258, 696-699.
- Naito, S. y Ueda, T. (1985). Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 44, 99-109.
- Nicklas, W. J., Krespan, B. y Berl, S. (1980). Effect of kainate on ATP levels and glutamate metabolism in cerebellar slices. *European J. Pharmacol.* 62, 209-213.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbert, A. y Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature (Lond.)* 307, 462-465.
- Nowycky, M., Fox, A. P. y Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature (Lond.)* 316, 440-443.
- Olney, J. W. y Price, M. T. (1980). Neuroendocrine interactions of excitatory and inhibitory aminoacids in GABA neurotransmission. *Brain Res Bull.* 5, 361-368.
- Olney, J. W., Fuller T. A. y Gubareff T. (1981). Kainate like neurotoxicity of folates. *Nature (Lond.)* 292, 165-166.
- Olney, J. W., Ho, O. L. y Rhee, V. (1971) Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing aminoacids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* 14, 61-76.
- Olney, J. W., Price, M. T. y Labruyere, J. (1986). The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 65, 65-71.
- Olney, J. W., Rhee, V. y Ho, O. L. (1974) Kainic acid : a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res.*, 77, 507-512.
- Olney, J. W., Fuller, T. A., Gubareff, T. y Labruyere, J. (1981). Intrastratial folic acid mimics the distant but no local brain damaging properties of kainic acid. *Neurosci. Lett.* 25, 185-191.
- Olverman H. J., Jones, A. W. y Watkins, J. C. (1984). L-glutamate has higher affinity than other aminoacids for $^3\text{H-D-AP}_5$ binding sites in rat brain membranes. *Nature (Lond.)* 307, 460-462 .

- Orrego, F. (1979). Criteria for the identification of central neurotransmitters and their application to studies with some nerve tissue preparations, in vitro. *Neuroscience* 4, 1037-1057.
- Pastuszco, A., Wilson, D. y Erecińska, M. (1984). Effects of kainic acid in rat brain synaptosomes: involvement of calcium. *J. Neurochem.* 43, 747-754 .
- Pontremoli, S. y Melloni S. (1986). Extralysosomal protein degradation. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 455-481.
- Potashner, S.J. y Gerard, D. (1983). Kainate enhanced release of ³H- aspartate from cerebral cortex and striatum : reversal by baclofen and pentobarbital. *J. Neurochem.* 40, 1548-1558.
- Proctor, W. R. y Dunwiddle, T.V. (1983) .Adenosine inhibits calcium spikes in hippocampal pyramidal neurones, in vitro. *Neurosci .Lett.* 35, 196-201.
- Rassin, D.K. (1972) .Aminoacids as putative transmitters: failures to bind to synaptic vesicles of guinea pig cerebral cortex. *J. Neurochem.* 19, 139-148.
- Reichelt, K.L. y Fonnum, F. (1969). Subcellular localization of N-acetyl aspartyl glutamate, N-acetyl glutamate and glutathione in brain. *J. Neurochem.* 16, 1409-1416.
- Retz, K. C., Young, A. C. y Coyle C.T. (1981). Effects of acidic excitatory aminoacids on ⁴⁵Ca accumulation by rat striatal synaptosomes. *Soc. Neurosci. Abstr.* 7, 108.
- Reuter, H. (1983) .Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature (Lond.)* 301, 569-574.
- Riveros, N. y Orrego, F. (1982) A search in rat brain cortex synaptic vesicles for endogenous ligands for kainic acid receptors. *Brain Res.* 236, 492-496.
- Riveros, N. y Orrego, F. (1984). A study of possible excitatory effects of N-acetyl aspartyl glutamate in different in vivo and in vitro brain preparations. *Brain Res.*, 299, 393-396.
- Riveros, N. y Orrego, F. (1986). N-methylaspartate activated calcium channels in rat brain cortex slice. Effect of calcium channels blockers and of inhibitory and depressant substances. *Neuroscience.* 17, 541-546.
- Riveros, N., Fiedler, J., Lagos, N., Muñoz, C. y Orrego, F. (1986). Glutamate in rat brain cortex synaptic vesicles: influence of the vesicle isolation procedure. *Brain Res.* 386, 405-408.

- Roberts, P.J. (1974a). Aminoacid release from isolated rat dorsal root ganglia. *Brain Res.* 74, 327-332.
- Roberts, P.J., (1974b). Glutamate receptors in rat central nervous system. *Nature (Lond.)* 252, 399-401.
- Roberts, P.J., Foster, G.A. y Thomas, E.M. (1981). Neurotoxic action of methyltetrahydrofolate in rat cerebellum unrelated to direct activation of kainate receptors. *Nature*, 293, 654-656 .
- Ross, D. H., (1976). Selective action of alcohols on cerebral calcium levels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 273, 280-284.
- Rothman, S. (1984). Synaptic release of excitatory aminoacid transmitters mediates anoxic neuronal death. *J. Neurosci.* 7, 1884-1891.
- Rothman, S. (1985). The neurotoxicity of excitatory aminoacids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.* 5, 1483-1489.
- Rubin, R. P. (1970). The role of calcium in the release of neurotransmitters substances and hormones. *Pharmacol. Rev.* 22, 389-428.
- Ruck, A., Kramer, S., Metz, J. y Brennan, M.J. (1980) Methyl tetrahydro folate is a potent and selective agonist for kainic acid receptors. *Nature (Lond.)* 287, 852-853.
- Scatton, B. y Lehmann, J. (1982). N-methyl-D-aspartate-type receptors mediate striatal ^3H - acetylcholine release evoked by excitatory aminoacids. *Nature (Lond.)* 297, 422-424.
- Schwarcz, R. y Fuxe, K. (1979). ^3H -Kainic acid binding: relevance for evaluating the neurotoxicity of kainic acid. *Life Sci.* 4, 1471-1480.
- Schwarcz, R., Scholz, D. y Coyle, J. T. (1978). Structure activity relationships for the neurotoxicity of kainate derivatives and glutamate analogues. *Neuropharmacol.* 17, 145-151.
- Seidler, F. J., Kirksey, D. F., Lau, C., Whitmore, W. L. y Slotkin, T. A. (1977). Uptake of (-) ^3H -norepinephrine by storage vesicles prepared from whole rat brain: properties of the uptake system and its inhibition by drugs. *Life Sci.* 21, 1075-1086.
- Seil, F., Blank, N. y Leiman, A. (1979). Toxic effects of kainic acid on mouse cerebellum in tissue culture. *Brain Res.* 161, 253-265.
- Shields, R., Falk, G. y Naghshinek, S. (1981). Action of glutamate and aspartate analogues on rod horizontal and bipolar cells. *Nature (Lond)* 294, 592-594.

Shinozaki, H. y Shibuya, G. (1974). Potentiation of glutamate induced depolarization by kainic acid in the crayfish opener muscle. *Neuropharmacology*. 13, 1057-1065.

Simon, J. P., Contrera, J. F. y Kuhar, M. (1976). Binding of ^3H kainic acid, an analogue of L-glutamate, to brain membranes. *J. Neurochem.* 26, 141-147.

Simon, J. P., Swan, J. H., Griffiths, T. y Meldrum, B. (1984). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226, 850-852.

Steinbusch, H. W. M., Verhofstad, A. A. J. y Joosten, H. W. J. (1978). Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: description of a specific and sensitive technique and some applications. *Neuroscience* 3, 811-819.

Steiner, H., Mc Bean, G., Kohler, C., Roberts, P. y Schwarcz, R. (1984). Ibotenate induced neuronal degeneration in immature rat brain. *Brain Res.* 307, 117-124.

Storm-Mathisen, J. y Iversen, L. L. (1978). Uptake of ^3H -glutamic acid in excitatory nerve endings: light and electronmicroscopic observations in the hippocampal formation of the rat. *Neuroscience* 4, 1237-1253.

Storm-Mathisen, J., Leknes, A., Bore, A. T., Vaaland, J. L., Edminson, P. y Ottersen, O. P. (1983). First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature (Lond.)* 301, 517-520.

Surtees, L. y Collins, G. G. S. (1985). Receptor types mediating the excitatory actions of exogenous L-aspartate and L-glutamate in rat olfactory cortex. *Brain Res.* 334, 287-295.

Taraskevich, P. S. y Douglas, W. W. (1982). GABA directly affects electrophysiological properties of pituitary pars intermedia cells. *Nature, Lond.* 229, 733-734.

Tauc, L. (1982). Non vesicular release of neurotransmitter. *Physiol. Rev.* 62, 857-893.

Teichberg, V. I., Tae N., Goldberg, O. y Luini, A. (1984). Barbiturates, alcohols and the CNS excitatory neurotransmission: Specific effects on the kainate and quisqualate receptors. *Brain Res.* 291, 285-292.

Tomiko, S. A., Taraskevich, P. S. y Douglas, W. W. (1983). GABA acts directly on cells of pituitary pars intermedia to alter hormone output. *Nature (Lond.)* 301, 706-707.

Vargas, O., Doria de Lorenzo, M., y Orrego, F. (1977). Effect of elevated extracellular potassium on the release of labelled noradrenalina, glutamate, glycine β -alanine and other aminoacids from rat brain cortex slices. *Neuroscience* 2, 383-390.

Vincent, S. R. y Mc Geer, E. (1980). A comparison of sodium-dependent glutamate binding with high-affinity glutamate uptake in the rat striatum. *Brain Res.* 184, 99-108.

Watkins, J. C. (1984). Excitatory aminoacids and central synaptic transmission. *Trends in Pharmacol. Sci.* 84, 373-376.

West, R. E. y Miller, R. J. (1983). Opiates second messengers and cell response. *Br. Med. Bull.* 39, 53-58.

Whittaker, V. P. (1984). The synaptic vesicle. *Handbook of Neurochem.* 2nd ed. Vol 7. A. Lajtha Ed. Plenum, N. Y. Cap 2, Pag 41-69.

Whittaker, V. P., Michaelson, A. y Kirkland, R. J. (1964). The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles (synaptosomes) *Biochem. J.* 90, 293-303.

Yamamoto, C. y Matsui, S. (1976). Effect of stimulation of excitatory nerve tract on release of glutamic acid from olfactory cortex slices in vitro. *J. Neurochem.* 26, 487-491.

Zaczek, R., Koller, K., Cotter, R., Heller, D. y Coyle, J. (1983). N-acetyl-aspartyl glutamate. An endogenous peptide with high affinity for a brain "glutamate" receptor. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.* 80, 1116-1119.

Zanotto, L. y Heinemann, U. (1983). Aspartate and glutamate induced reductions in extracellular free calcium and sodium concentrations in area CA1 of in vitro hippocampal slices of rats. *Neurosci. Lett.* 35, 79-84.

Zieglgánsberger, W. y Bayerl, H. (1976). The mechanism of inhibition of neuronal activity by opiates in the spinal cord of the cat. *Brain Res.* 115, 111-128.