
EL GLUTAMATO EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS: DE LOS RECEPTORES MEMBRANALES A LA REGULACIÓN GÉNICA

FROM GLUTAMATE RECEPTOR ACTIVATION TO GENE EXPRESSION IN THE VERTEBRATE RETINA

A. M. LÓPEZ-COLOMÉ *, J.
MURBARTIÁN*

* Instituto de Fisiología Celular,
Depto. de Neurociencias, UNAM.
Apartado Postal 70-253, 04510,
México, D.F.

RESUMEN

Se presenta en forma condensada la información actual acerca de la función de los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato como neurotransmisores en el sistema nervioso central en general, y en la retina de los vertebrados en particular. La diversidad en los efectos de estos compuestos se explica por la presencia de numerosos tipos de receptores membranales para los mismos, que presentan estructura química y mecanismos de transducción diferentes, como son la apertura de canales iónicos y la activación de cascadas de segundos mensajeros intracelulares. Se describen las características de estos receptores establecidas mediante el uso de técnicas de biología molecular, así como su distribución en la retina y cultivos primarios de neuronas y glia derivados de la misma. Se hace énfasis en la propiedad, recientemente descubierta de la glia de responder a los neurotransmisores, lo que abre la posibilidad de una nueva red de comunicación en el sistema nervioso.

ABSTRACT

In this brief review, the function of the excitatory amino acids glutamate and aspartate as neurotransmitters in the nervous system and the vertebrate retina is analyzed. These compounds induce a whole range of cellular responses, due to the presence of distinct types of receptors in postsynaptic cells, showing differences in structure as well as signal transduction mechanisms such as ligand-gating of ion channels or activation of second messenger cascades. The characteristics of these receptors are described in the light of molecular biology studies, and their distribution in neurons and glia from the retina is also documented. Attention is drawn to the recent finding of glial cell excitability in response to neurotransmitters, which opens a new line of cell communication within the nervous system.

Organización General de la Retina de los Vertebrados

MORFOLOGÍA

La retina de los vertebrados se considera como un buen modelo para el estudio del sistema nervioso central (SNC), debido principalmente a su organización estratificada y al número reducido de tipos celulares que la integran (Farber y Adler, 1986). Está constituida por cinco tipos de neuronas: los fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares, las células ganglionares, las células horizontales y las células amacrinas y por dos clases de células gliales: las células de Müller y los astrocitos (Newman, 1985). Existen dos estratos en los que se establecen sinapsis: la capa plexiforme externa (fotorreceptores con células bipolares y células horizontales) y la capa plexiforme interna (células bipolares con amacrinas y ganglionares). Los somas de los fotorreceptores se localizan en la capa nuclear externa, mientras que los de las células horizontales, bipolares y amacrinas forman la capa nuclear interna (Dowling, 1970; Fig. 1).

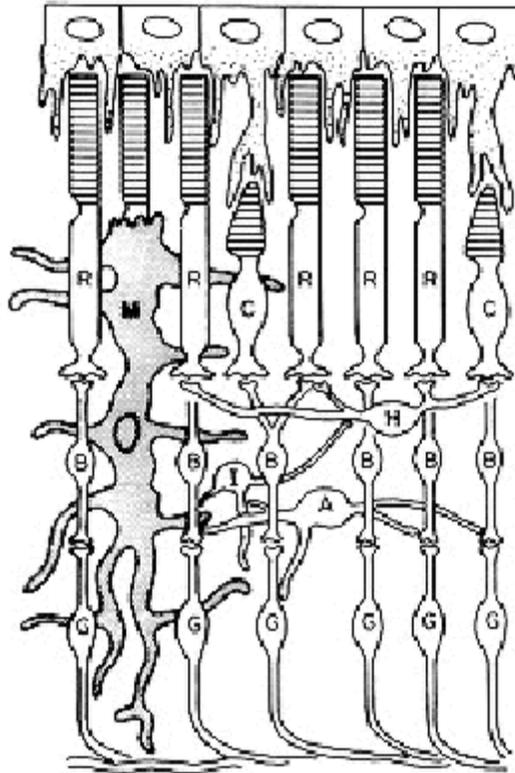


Figura 1. Diagrama de las capas de la retina de los vertebrados y sus relaciones sinápticas. C. conos; R. bastones; H. Células horizontales; B. células bipolares; A. células amacrinas; G. células ganglionares; M. Células de Müller (Farber y Adler, 1986).

En los fotorreceptores se distinguen dos regiones: el segmento externo, el cual contiene los pigmentos que absorben la luz de diferentes longitudes de onda y el segmento interno, que contiene los organelos subcelulares, así como las terminales sinápticas que conectan con las células horizontales y bipolares. Las células bipolares transmiten en sentido vertical la información visual de la capa plexiforme externa a la capa plexiforme interna, donde hacen sinapsis con las células ganglionares. Los axones de las células ganglionares convergen para formar el nervio óptico, cuya salida constituye un punto ciego del campo visual (Dowling, 1970).

FISIOLOGÍA

El fenómeno de transducción de la señal luminosa en una señal química constituye el primer paso del proceso visual (Schnapf y Baylor, 1987). En la oscuridad, los iones sodio entran al segmento externo de los fotorreceptores debido al gradiente electroquímico de sodio generado por la ATPasa de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ en el segmento interno. La estimulación luminosa excita a la rodopsina, y ésta activa a la transducina (miembro de la familia de las proteínas G), la que a su vez estimula a una fosfodiesterasa que hidroliza al GMPc. Al bajar la concentración de GMPc, los canales de sodio activados por éste se cierran, y la membrana de los fotorreceptores se hiperpolariza.

La vía vertical de los fotorreceptores a las células bipolares y de éstas a las células ganglionares es excitadora, y está modulada en sentido lateral por dos tipos de interneuronas inhibitorias: en la capa plexiforme externa las células horizontales y en la capa plexiforme interna, las células amacrinas. Así puede decirse de una manera general que mientras que las células horizontales modulan la información que llega a la retina, las amacrinas lo

hacen con la que sale de la misma hacia centros superiores de integración. A partir de las células bipolares la vía visual se dicotomiza en ON y OFF, ya que una población de estas células responde al neurotransmisor con una hiperpolarización de la membrana (ON), mientras que otra población lo hace con una despolarización (OFF). Ambos efectos se producen por el mismo neurotransmisor, y la diferencia en la respuesta se debe a la presencia de receptores a glutamato diferentes en las células postsinápticas. Estos receptores pueden distinguirse farmacológicamente ya que los de las bipolares ON responden al 2-amino-4-fosfonabutarato (AP4), mientras que los de las bipolares OFF se activan con kainato (KA) (Miller y Slaughter, 1986).

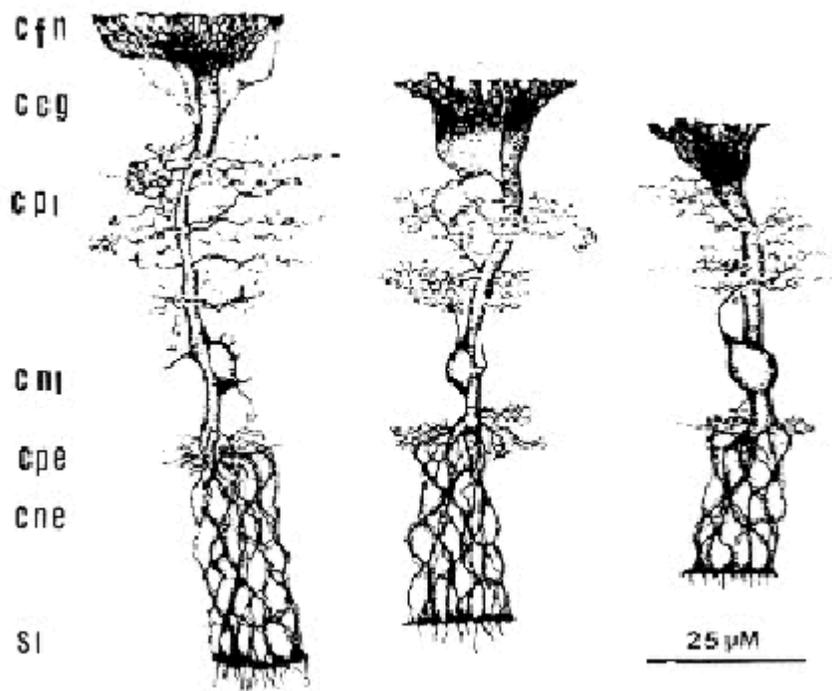


Figura 2. Dibujos en cámara lúcida de células de Müller y su ubicación respecto a las diferentes capas de la retina. CFN. capas de fibras nerviosas; CCG. capas de células ganglionares; CPE. capa plexiforme externa; CNI. capa nuclear interna; CNE; capa nuclear externa; SI. segmento interno del receptor (Robinson y Dreher, 1990).

GLIA DE LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS

En la retina de los vertebrados se han identificado dos tipos de glia: las células de Müller y los astrocitos. Los astrocitos son células pequeñas que se encuentran en la capa interna de la retina, cerca del disco óptico, y rodeando a los capilares de las retinas vascularizadas (Rasmussen, 1974). Las células de Müller son una forma especializada de los astrocitos tipo 1, son inmunopositivas para la proteína fibrilar ácida (GFAP) (Bignami, 1984) y constituyen el elemento glial más abundante de la retina de los vertebrados (Bussow, 1980; Fig. 2). Se orientan radialmente desde la capa de los fotorreceptores hasta la capa de células ganglionares; son células bipolares y su núcleo está al nivel de la capa nuclear interna. La función de las células de Müller no se conoce con precisión, pero se ha demostrado que además de establecer un recambio metabólico con las neuronas, mantienen la homeostasis iónica y su presencia es fundamental para la estratificación de la retina durante el desarrollo embrionario. Numerosas prolongaciones de las células de Müller se extienden lateralmente a través de las capas plexiformes y están en íntima asociación con las dendritas neuronales y las sinapsis (Robinson y Dreher, 1990). El potencial de membrana de estas células está determinado por la concentración externa de K^+ , y es cercano a $-80mV$. Otra característica importante de las células de Müller es que al igual que otros tipos de células gliales, poseen canales

iónicos sensibles al voltaje, tanto de Ca^{2+} como de K^+ , los que podrían intervenir en la regulación de la concentración extracelular de este último en la retina (Newman, 1985).

Tanto los astrocitos como las células de Müller se comunican por medio de "uniones comunicantes", lo cual permite la transferencia de señales químicas a larga distancia entre ellas (Mobbs *et al.*, 1988). Asimismo, ambos tipos de glia forman parte de la barrera hematorretiniana (Bussow, 1980).

Neurotransmisores en la Retina de los Vertebrados

Los neurotransmisores que emplean los diferentes subtipos de neuronas de la retina son muy variados: aminoácidos, catecolaminas, acetilcolina y una gran variedad de péptidos. La vía vertical excitadora parece utilizar aminoácidos; ésta información se ha obtenido mediante estudios farmacológicos aplicando a las células agonistas y antagonistas del transmisor postulado (Massey, 1990).

Los fotorreceptores liberan tónicamente el neurotransmisor a las células bipolares y horizontales adyacentes en la oscuridad. Al iluminar la retina, la membrana de los fotorreceptores se hiperpolariza y se suprime la liberación del neurotransmisor; esto causa la hiperpolarización de las células horizontales y de las células bipolares tipo OFF, al mismo tiempo que despolariza a las células bipolares tipo ON. Existen evidencias que apoyan la idea de que los neurotransmisores liberados por los fotorreceptores de retinas de vertebrados, son los aminoácidos excitadores, el ácido L-glutámico (Glu) y el ácido L-aspártico (Asp). Mediante registros electrofisiológicos intracelulares y estudios farmacológicos en retinas aisladas, se demostró que el Asp y el Glu mimetizan la acción del transmisor de los fotorreceptores sobre las células bipolares y horizontales. Aunque es difícil distinguir el efecto del L-Glu y del L-Asp, se ha visto que el primero actúa sobre células bipolares y horizontales aisladas a concentraciones mucho menores que el L-Asp, lo que sugiere que el Glu es el transmisor endógeno de los fotorreceptores (Steward *et al.*, 1985). Estos aminoácidos excitadores (AAE) también actúan directamente sobre células ganglionares y varios tipos de células amacrinas.

La inhibición lateral por las células horizontales en la capa plexiforme externa y algunas células amacrinas en la capa plexiforme interna, se lleva a cabo por la liberación de transmisores como el ácido g-amino butírico (GABA) y la glicina (Gly), así como de una extensa gama de péptidos, entre otros (Brandon, 1985).

Clasificación de los Receptores a Aminoácidos Excitadores

El Glu es el neurotransmisor excitador más abundante en el SNC de los vertebrados (Colman *et al.*, 1987). Se ha demostrado que juega un papel importante en el desarrollo neuronal, en la plasticidad sináptica (Collingridge y Singer, 1990), el aprendizaje y la memoria (Bliss y Collingridge, 1993), así como en procesos de toxicidad y enfermedades degenerativas del sistema nervioso (Choi, 1988). Esta diversidad de funciones del Glu se debe, en gran medida, a los diferentes tipos de receptores específicos con los que interactúa. Los receptores a Glu se clasifican en dos grandes grupos: los ionotrópicos, proteínas heteroméricas en las que el ligando controla la apertura de un canal iónico, y los metabotrópicos, acoplados a efectores intracelulares y cascadas de segundos mensajeros por medio de una proteína que une GTP (proteína G; Gasic y Hollmann, 1992).

RECEPTORES IONOTROPICOS

Los receptores ionotrópicos comprenden cuatro tipos definidos por sus agonistas: N-metil-D-aspartato (NMDA), μ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA), kainato (KA) y 2-amino-4-fosfonobutirato (LAP4). La activación de estos receptores se traduce en la apertura de canales iónicos que permiten el paso de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , los cuales tienen diferentes propiedades de apertura, permeabilidad iónica, conductancia y farmacología (Cotman e Iversen, 1987).

Receptores a NMDA

Los receptores del tipo NMDA son permeables al Ca^{2+} y al Na^+ , por lo que su activación produce un

incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. El canal del receptor NMDA en condiciones fisiológicas está bloqueado por Mg^{2+} ; este bloqueo depende del voltaje, y se suprime cuando se despolariza la membrana (Fig. 3). Además del sitio de reconocimiento para el Glu, el receptor de NMDA posee un sitio alostérico positivo para la Gly, la que actúa como coagonista (Ascher y Nowak, 1987). En la cara externa del canal iónico, este receptor tiene un sitio modulador negativo para el Zn^{2+} y a diferencia del bloqueo por Mg^{2+} , el bloqueo por Zn^{2+} no depende del voltaje. Algunas poliaminas también regulan la actividad del receptor de tipo NMDA, incrementando la unión tanto al sitio de reconocimiento como al de la Gly (Williams *et al.*, 1991). Los neurotransmisores endógenos para este receptor parecen ser el LGlu y el LAsp (Watkins *et al.*, 1990) y su distribución en el SNC sugiere que podrían tener una función importante en la conducta, el aprendizaje y la memoria (Bliss y Collingridge, 1993).

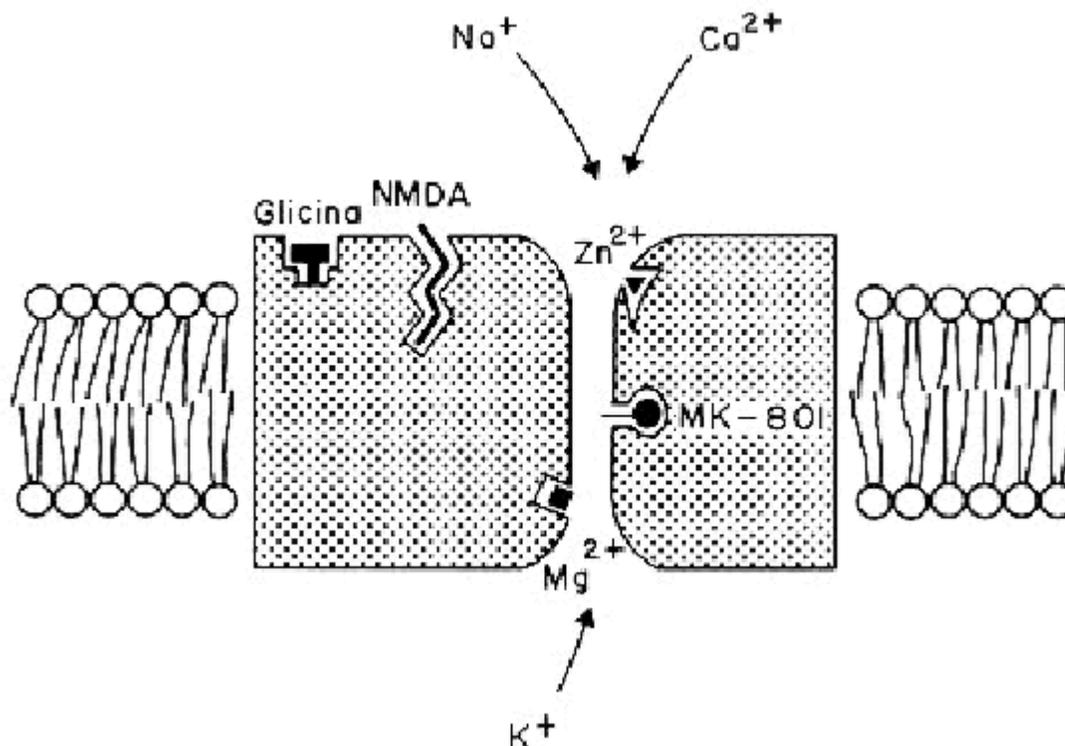


Figura 3. Receptores a NMDA. Es una proteína integral, oligomérica que presenta un sitio de reconocimiento para el neurotransmisor (NMDA), un sitio alostérico positivo para la glicina, un canal catiónico en el interior del cual hay un sitio para antagonistas alostéricos (anestésicos disociativos, MK-801) y dos sitios para los iones Mg^{2+} y Zn^{2+} que bloquean el paso de cationes por el canal.

Receptores a AMPA

Originalmente el receptor a AMPA fue llamado receptor de quisqualato (Quis), sin embargo se ha demostrado que el Quis no es un agonista selectivo, ya que se une con alta afinidad a los receptores de KA y a los metabotrópicos (Young y Fagg, 1990). Estos receptores son selectivos para cationes monovalentes, y su localización, paralela a los de NMDA (Cotman *et al.*, 1987), permite suponer que están relacionados con el componente rápido de los potenciales postsinápticos excitadores que precede a la activación dependiente de voltaje de los receptores de NMDA (Gasic y Hollmann, 1992).

Receptores a kainato

Es difícil discernir entre los receptores de AMPA y los receptores de KA. Aunque se ha sugerido que el efecto neurofisiológico del KA pudiera deberse a su interacción con el receptor de AMPA, se han identificado sitios de unión a KA de alta afinidad, insensibles tanto a Quis como a AMPA (Barnard y Henley, 1990).

Receptores a L-AP4

El LAP4 mimetiza la acción del transmisor endógeno de los fotorreceptores en las células bipolares ON de la retina, y por tanto inhibe la neurotransmisión en la vía ON. Se ha sugerido que el transmisor cierra canales iónicos postsinápticos en estas células, sin embargo otros autores proponen una localización presináptica de los receptores a L-AP4 (Young y Fagg, 1990).

RECEPTORES METABOTRÓPICOS

Los receptores metabotrópicos de Glu están acoplados a una proteína G y activan cascadas de segundos mensajeros: estimulan la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato en la membrana, que genera trifosfato de inositol (IP₃) y diacil glicerol (DAG), o bien modifican la concentración de AMPc mediante la activación o inhibición la adenilato ciclasa, enzima responsable de su síntesis (Schoepp y Conn, 1993). Estos receptores integran una familia con una secuencia (de aminoácidos) muy similar: todos ellos poseen siete segmentos transmembranales, el extremo NH₂-terminal es extracelular y la región COOH-terminal, intracelular; ambas son ricas en residuos de aminoácidos hidrofílicos. Pueden identificarse por medio del uso de agonistas y antagonistas selectivos.

BIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES A AMINOÁCIDOS EXCITADORES

RECEPTORES IONOTRÓPICOS

Receptores a NMDA

La primera cadena de DNA con una secuencia que codifica para una subunidad del receptor NMDA (NMDAR1), se clonó a partir de una biblioteca de DNAc de cerebro anterior de rata y se caracterizó después de expresarla en ovocitos de *Xenopus* (Gasic y Hollmann, 1992). Secuencias que codifican para otras cuatro subunidades de este receptor (NMDAR2A, B, C, D) se clonaron por su homología con NMDAR1 empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Monyer *et al.*, 1992). El NMDAR1 expresado en ovocitos de *Xenopus* presenta muchas de las características del receptor nativo de NMDA (Gasic y Hollmann, 1992). Sin embargo, las propiedades de modulación entre las que se incluye el bloqueo por Mg²⁺, la sensibilidad a la Gly y la cinética de apertura del canal residen en la subunidad NMDA-R2, lo cual indica que en su forma nativa el receptor es heteromérico (Wisden y Seeburg, 1993). El ligando se une a la región NH₂-terminal del receptor que es extracelular; a ésta le siguen cuatro dominios transmembranales y el dominio COOH-terminal, también extracelular. El poro del canal del receptor está formado por el segmento transmembranal 2 ó TM2 (Gasic y Hollmann, 1992).

La subunidad NMDAR1 se expresa prácticamente en todas las neuronas, mientras que la subunidad NMDAR2 es específica de ciertas áreas del SNC y confiere propiedades diferentes a los receptores en las mismas (Monyer *et al.*, 1992). Se han encontrado siete formas (NMDAR1A a NMDAR1G) de la subunidad NMDAR1, todas las cuales inducen una corriente entrante en respuesta a la aplicación de NMDA (Durand *et al.*, 1992).

Receptores NO-NMDA

Se ha clonado una familia de 9 subunidades relacionadas entre sí por la homología en su secuencia, que forman un complejo canal-receptor AMPA/KA (Gasic y Hollmann, 1992; Nakanishi, 1992).

Las subunidades GluR1-4 de los receptores noNMDA tienen alta afinidad por AMPA, mientras que las subunidades GluR5-7, así como las K-1 y K-2 unen selectivamente al KA (Nakanishi *et al.*, 1992). Su estructura es característica de los receptores ionotrópicos: el dominio NH₂-terminal es extracelular, con seis posibles sitios de glicosilación y tienen cuatro dominios transmembranales, de los cuales TM2 forma el canal iónico del receptor. En una región intracelular que se localiza entre los segmentos TM3 y TM4, posee varias secuencias de consenso para regulación por fosforilación y el extremo COOH-terminal es extracelular (Nakanishi, 1992). Los receptores ionotrópicos de tipo AMPA en su estado nativo, parecen ser heteroméricos (Gasic y Hollmann, 1992).

Todas las cadenas de GluR tipo AMPA expresadas independientemente son permeables al Na^+ y al Ca^{2+} , con excepción de la GluR2 la cual no es permeable al Ca^{2+} debido al cambio de un aminoácido en el segmento TM-2 por un proceso de edición postranscripcional (Verdoorn *et al.*, 1991). En las células de glia de Bergmann del cerebelo y de Müller de la retina se han identificado receptores de AMPA permeables al calcio, y se ha demostrado consecuentemente, que carecen del mensaje para la síntesis de GluR2 (López *et al.*, 1994).

Además de la variedad de receptores que se genera por el ensemble heteromérico y las reacciones de edición, cada uno de los receptores GluR1-4 existe en dos formas moleculares originadas por "corte alternativo" llamadas "flip" y "flop", las cuales difieren tanto en su secuencia como en su respuesta a LGlu, a AMPA y a KA. La expresión de estas subunidades varía no sólo en su distribución anatómica sino durante el desarrollo del SNC (Gasic y Hollmann, 1992).

Los receptores GluR5-7 unen KA con alta afinidad y presentan una homología de aproximadamente 80% entre ellos, y de 40% con los GluR1-4 (Nakanishi, 1992). Su significado fisiológico se desconoce.

RECEPTORES METABOTRÓPICOS

Se han clonado 6 secuencias diferentes que codifican para receptores metabotrópicos de Glu (mGluR1a6) (Nakanishi, 1992). De acuerdo con su homología de secuencia y el sistema de segundos mensajeros al cual se acoplan, se han formado tres grupos (Schoepp y Conn, 1993; Nakanishi, 1992).

- 1) mGluR1 μ , mG1rR1b, y mGluR5. Su activación estimula la hidrólisis de fosfoinosítidos. El mGluR1 μ además, produce una elevación del AMPc por estimular a la adenilato ciclasa.
- 2) mGluR2 y mGluR3. Su activación produce la inhibición de la adenilato ciclasa y por lo tanto una disminución de la concentración intracelular de AMPc.
- 3) mGluR4 y mGluR6. Su activación inhibe la acumulación de AMPc inducida por la forskolina (activador de la adenilato ciclasa). Estos receptores tienen como agonista al AP4.

Efectos a Largo Plazo por la Activación de los Receptores A Aminoácidos Excitadores

La activación de los receptores a neurotransmisores no sólo produce cambios a corto plazo en las células del SNC sino también, a través de segundos mensajeros, puede dar lugar a modificaciones a largo plazo en el fenotipo celular. Poco se sabe al respecto; sin embargo, actualmente se estudia la función de ciertos proto-oncogenes inducibles que se expresan tempranamente cuyos productos modifican la expresión de otros genes (Morgan y Curran, 1991; Fig. 4). El estudio de estos procesos es de suma importancia, ya que nos permitirá explicar la forma en que los factores externos modifican la expresión de la información contenida en los genes.

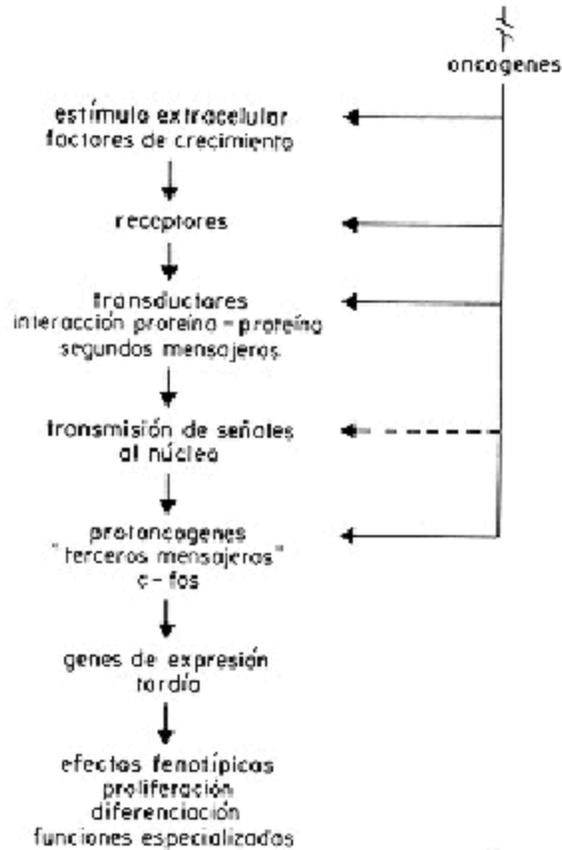


Figura 4. Modificación de la expresión génica por estímulos extracelulares. Los protooncogenes como c-fos, se activan minutos después de recibir una señal: a su vez, durante un período de horas a días, los factores de transcripción codificados por los protooncogenes, afectan a genes secundarios o terciarios llamados genéricamente "genes tardíos", cuyos productos a su vez participan en la división celular, la diferenciación y otros procesos celulares.

Genes Tempranos y Factores de Transcripción

De los protooncogenes que han sido descritos, fos y jun son los más claramente relacionados con la activación de los receptores a Glu. Los productos de los mismos, las proteínas Fos y Jun actúan como factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos.

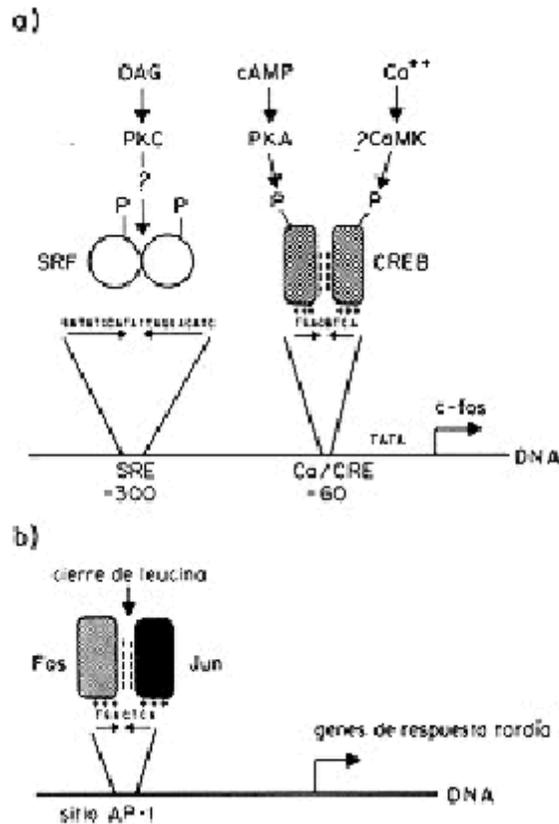


Figura 5. Inducción de c-fos por la activación de la síntesis de segundos mensajeros. a) La vía de los fosfoinosítidos activa la transcripción de c-fos mediante la activación de la PKC por diacil glicerol (DAG); esta enzima fosforila al factor SRF, el cual interactúa con una secuencia específica en el DNA (SRE) que se encuentra 300 pares de bases del sitio de iniciación del mensaje. La activación de c-fos por Ca^{++} y AMPc se da por la activación de cinasas de serina y treonina: PKA y CaMK; éstas fosforilan el factor de transcripción CREB, que se une a una secuencia de consenso en el DNA (Ca/CRE), localizada 60 pares arriba del mensaje. La activación de c-fos se traduce en la síntesis de la proteína Fos, que regresa al núcleo. b) Fos forma un dímero con el producto de otro protooncogene, Jun, mediante un "cierre de leucina", y éste se une a la secuencia del consenso en el DNA (sitio AP-1), que regularía la expresión de "genes de expresión tardía" hipotéticos.

El protooncogene c-fos se describió como el oncogene codificado por el virus del osteosarcoma Finkel-Biskis Jinkis de ratón (FBJ-MSV). Posee varios elementos que regulan su expresión (Fig. 5), localizados hacia arriba de la región 5' del gene, entre los que se encuentra el elemento que responde al suero (SRE) que al unirse con una proteína nuclear de 67 kDa llamada factor que responde al suero (SRF), induce la expresión de c-fos. Otra secuencia reguladora de la expresión de c-fos en el DNA recibe el nombre de Ca/CRE, y se activa por la unión del llamado elemento que responde al AMPc (CREB). El SRF se une al DNA como consecuencia de la activación de la cascada de los fosfoinosítidos, y el CREB por la activación de una cinasa dependiente de calcio y calmodulina.

c-fos codifica para una proteína de 62 kDa llamada Fos; el proto-oncogene c-jun, identificado como el oncogene del virus del sarcoma de aye 17 (ASV-17), codifica para la proteína Jun de 40 kDa. Fos y Jun funcionan directamente como reguladores de la transcripción al formar ya sea un heterodímero, o bien un homodímero de Jun, el cual se une a la secuencia AP-1 (TGACTCA) en el DNA. Los productos de los protooncogenes se dimerizan mediante los llamados "cierres de leucina", que son μ -hélices anfipáticas orientadas paralelamente, las que contienen 4 ó 5 leucinas a intervalos de siete residuos. La unión del dímero con el DNA activa genes que poseen en su promotor la secuencia de consenso para AP-1 (Morgan y Curran, 1991).

Síntesis de Segundos Mensajeros y Activación de Protoncogenes por la Estimulación de Receptores a Glutamato

Varios estudios han demostrado la existencia de vías de segundos mensajeros que aumentan la concentración intracelular de Ca^{2+} y que relaciona con la activación de protoncogenes. El Glu induce la transcripción de genes tempranos tanto a través de la activación de los mGluRs (Sonnenberg *et al.*, 1989) como por la activación de receptores a Glu del tipo ionotrópico, NMDA y KA. Un fenómeno común en ambos casos es el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , ya sea procedente del medio extracelular o bien liberado de pozas intracelulares (Penner *et al.*, 1993). En el caso de los receptores ionotrópicos, la entrada de Ca^{2+} extracelular activa a numerosas cinasas de proteína como la PKC, que requiere DAG (Berridge, 1984; Bell, 1986), la PKA, que se activa por AMPc, y a algunas cinasas dependientes de calmodulina (CaM) (Schulman, 1993), las cuales fosforilan a factores de transcripción como el SRF (Fig. 5), activando así la transcripción de c-fos (Choi *et al.*, 1993; Lerea y McNamara, 1993). La estimulación de los receptores a Glu de tipo metabotrópico induce la transcripción de genes tempranos, ya que aumenta la hidrólisis de fosfoinosítidos de la membrana para formar IP_3 y DAG; el IP_3 libera Ca^{2+} de pozas intracelulares que junto con el DAG (Berridge, 1984), activa a la PKC, y por tanto la expresión de los genes tempranos (Morgan y Curran, 1991; Mayer y Miller, 1990).

Receptores a AAE en la Retina de los Vertebrados

Se propone que el Glu y el Asp actúan como neurotransmisores endógenos en la retina (Steward *et al.*, 1985) ya que satisfacen la mayor parte de los criterios bioquímicos, farmacológicos y electrofisiológicos para ello, incluyendo la presencia de todos los subtipos de receptores a glutamato (López-Colomé, 1986).

Las células bipolares y horizontales de algunas especies responden a los agonistas de los receptores no-NMDA y ésta respuesta se bloquea al aplicar un antagonista general de los receptores ionotrópicos (Miller y Slaughter, 1986). Asimismo la respuesta de las células amacrinas de anfibios inducida por la aplicación de Quis y NMDA así como la de cierto tipo de células ganglionares inducida por luz (Hensley *et al.*, 1993), se bloquean con antagonistas de los receptores ionotrópicos no-NMDA.

Los receptores a Glu en membranas de células de la retina de pollo se han caracterizado mediante la unión de ligandos marcados radiativamente. Se localizan preferentemente en células amacrinas, ganglionares y horizontales, y en menor proporción, en células bipolares (López-Colomé, 1986). Se han caracterizado receptores tanto del tipo NMDA (López-Colomé y Somohano, 1992), como de KA y AMPA (López-Colomé y Somohano, 1987), y se demostró que su expresión y propiedades farmacológicas se modifican durante los diferentes estados del desarrollo embrionario (Somohano *et al.*, 1988).

En la retina de la rata por medio de hibridación *in situ*, se ha demostrado que los 5 genes que codifican para las subunidades de los receptores ionotrópicos tipo no-NMDA GluR1a5, se expresan de manera diferencial. Las células ganglionares expresan las subunidades GluR 1 a 4; GluR2 y GluR4 se localizan en la capa nuclear interna, mientras que las células amacrinas expresan todas las subunidades (Müller *et al.*, 1992). También se ha encontrado el RNAm que codifica para el receptor metabotrópico mGluR6 en la retina, y sus características son muy similares a las del receptor de AP4 de las células bipolares ON (Nakanishi, 1992).

Recientemente se demostró que no sólo las neuronas sino también las células gliales (astrocitos) responden a la aplicación de agonistas de AAE con una despolarización de la membrana (Backus *et al.*, 1989), lo que abre una nueva perspectiva de comunicación en el sistema nervioso. Este mecanismo también se presenta en la glia de la retina (Brew y Attwell, 1987), en la que se han identificado bioquímicamente tres poblaciones de receptores con alta afinidad por el Glu ($K_B = 40, 200, \text{ y } 1300 \text{ nM}$), las cuales se expresan de manera específica durante el proceso de diferenciación de estas células en cultivo (López-Colomé y Romo, 1991). Por medio de hibridación con oligonucleótidos específicos para las subunidades GluR1-4 de los receptores de AMPA, se confirmó la presencia de los RNAm para las subunidades GluR1,3 y 4, pero no para la subunidad GluR2, lo que confirma que estos receptores son permeables al Ca^{2+} (López *et al.*, 1994).

También se ha demostrado la presencia de receptores metabotrópicos a Glu similares a los neuronales en estas células, acoplados a sistemas de segundos mensajeros: agonistas de los receptores a Glu estimulan tanto la

hidrólisis de PIP₂ a IP₃ y DAG, como la activación de la PKC, y el aumento de Ca²⁺ intracelular (López-Colomé *et al.*, 1993). La activación de esta cascada metabólica está directamente relacionada con la inducción de la expresión de protooncogenes. Consecuentemente, se ha demostrado que los AAE, principalmente el L-Glu y el NMDA estimulan la formación de AP-1 y su unión al DNA en las células de Müller (López-Colomé *et al.*, en prensa). Puesto que la cascada del fosfatidil inositol también se activa con estos agonistas, podría ser una de las vías a través de las cuales se controla la expresión génica tanto en las neuronas como en la glia de la retina.

La función del Glu en la retina y en el SNC en general es múltiple, compleja y sujeta a mecanismos finos de regulación que controlan desde su concentración extracelular hasta su efecto sobre el genoma, pasando por la estimulación de receptores membranales y la activación de cascadas de segundos mensajeros. El avance de las nuevas técnicas de biología molecular contribuirá de manera importante en el futuro, a esclarecer la función de los AAE tanto en los procesos normales como en las alteraciones del sistema nervioso que conducen a estados patológicos.

LITERATURA CITADA

- ASCHER, P. Y L. NOWAK, 1987. Electrophysiological studies of NMDA receptors. *Trends Neurosci.*, 10:248-288.
- BACKUS, K.H., H. KETTENMANN Y M. SCHACHNER, 1989. Pharmacological characterization of the glutamate receptors in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 22: 274-282.
- BARNARD, E.A. Y J.M. HENLEY, 1990. The non-NMDA receptors: types, protein structure and molecular biology. *Trends Pharm. Sci.*, 11: 500-507.
- BELL, R.M., 1986. Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell*, 45:631-632.
- BERRIDGE, M. 1984. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *J. Biochem.*, 220:345-360.
- BIGNAMI, A., 1984. Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. *Brain Res.*, 300: 175- 178.
- BLISS, T.V.P. Y G.L. COLLINGRIDGE, 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361: 31-39.
- BRANDON, C., 1985. Retinal GABA neurons: Localization in vertebrate species using an antiserum to rabbit brain glutamate decarboxylase. *Brain Res.*, 344: 286-295.
- BREW, H. Y D. ATTWELL, 1987. Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature*, 327:707-709.
- BUSSOW, H., 1980. The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. *Cell Tissue Res.*, 206: 367-378.
- CHOI, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1: 623-634.
- CHOI, E., Z. XIA, E.C. VILLACRES Y D.R. STORM, 1993. The regulatory diversity of the mammalian adenylyl cyclases. *Curr. Op. Cell Biol.*, 5:269-273.
- COLLINGRIDGE, G.L. Y W. SINGER, 1990. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharm. Sci.*, 11: 290-296.
- COTMAN, C.W. Y L.L. IVERSEN, 1987. Excitatory amino acids in the brain: focus on NMDA receptors. *Trends Neurosci.*, 10: 263-265.
- COTMAN, C.W., D.T. MONAGHAN, O.P. OTTERSEN Y J. STORM-MATHISEN, 1987. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci.*, 10: 273-280.
- DOWLING, J.E., 1970. Organization of vertebrate retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 9: 655-680.
- DURAND, G.M., P. GREGOR, X. ZHENG, M.V.L. BENNETT, G.R. UHL Y R.S. ZUKIN, 1992. Cloning of an apparent

- splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR-1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 9359-9363.
- FARBER, D. Y R. ADLER, 1986. The retina. A model for cell biology studies. Academic Press, Inc. Orlando, USA.363p.
- GASIC, G.P. Y M. HOLLMANN, 1992. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annul Rev. Physiol.*, 54:507-536.
- HENSLEY, S.H., X. YANG Y S.M. WU, 1993. Identification of glutamate receptor subtypes mediating inputs to bipolarcells and ganglion cells inthe tigersalamander retina. *J. Neurophysiol.*, 69: 2099-2107.
- LEREA, L.S. Y J.O. MCNAMARA, 1993. Ionotropic glutamate receptor subtypes activate c-fos transcription by distinct calcium-requiring intracellular signaling pathways. *Neuron*, 10: 31-41.
- LÓPEZ, T., A.M. LÓPEZ-COLOMÉ Y A. ORTEGA, 1994. AMPA/KA receptor expression in radial glia. *Neuroreport*, 5: 504-506.
- LÓPEZ-COLOMÉ, A.M., 1986. Amino acids as excitatory transmitters in the retina. p. 143- 157. *In Excitatory amino acids*. P.J. Roberts, J. Storm-Mathisen y H.F. Bradford (Eds.). Macmillan Press Ltd., Londres. 508 p.
- LÓPEZ-COLOMÉ, A.M. Y F. SOMOHANO, 1987. Characterization of quisqualate-type L-glutamate receptors in the retina. *Brain Res.*, 414: 99-108.
- LÓPEZ-COLOMÉ, A.M. Y F. SOMOHANO, 1992. N-Methyl-D-aspartate receptors in the retina: 3-[(±)2-carboxypiperazin-4-y1] propyl-1-phosphonic acid (CPP) binding studies. *Neuropharmacology*, 31: 577-584.
- LÓPEZ-COLOMÉ, A.M. Y M. ROMO DE VIVAR, 1991. Excitatory amino acid receptors in primary cultures of glial cells from the retina. *Glia*, 4:431-439.
- LÓPEZ-COLOMÉ, A.M., ORTEGA, A. Y M. ROMO DE VIVAR, 1993. Excitatory amino acid-induced phosphoinositide hydrolysis in Müller glia. *Glia*,9:127-135.
- LÓPEZ-COLOMÉ, A.M., J. MURBATIÁN Y A. ORTEGA, 1994. Excitatory amino acid-induced AP 1 DNA binding activity in Müller glia. *J. Neurosci. Res.*, en prensa.
- MASSEY, S.C., 1990. Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Prog. Retinal Res.*, 9:399-425.
- MAYER, M.L. Y R.J. MILLER, 1990. Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of inhacellular Ca²⁺ in mammalian neurons. *Trends Pharm. Sci.*, 11: 254-60.
- MILLER, R.F. Y M.M. SLAUGHTER, 1986. Excitatory amino acid receptors of the retina: diversity of subtypes and conductance mechanisms. *Trends Neurosci.*, 9: 211 -218.
- MOBBS, P., H. BREW Y D. ATTWELL, 1988. A quantitative analysis of glial cell coupling in the retina of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Brain Res.*, 460:235-245.
- MONYER, H., R. SPRENGEL, R. SCHOEPFER, A. HERB, M. HIGUCHI, H. LOMELI, N. BURNASHEV, B. SAKMANN Y P.H. SEEBURG, 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256: 1217-1221.
- MORGAN, J.I. Y CURRAN, T., 1991. Stimulus transcription coupling in the nervous system involvenen of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14:421-451.
- MÜLLER, F., U. GREFERATH, H. WASSLE, W. WISDEN. Y P. SEEBURG, 1992. Glutamate receptors expression in the rat retina. *Neurosci. Lett.*, 138: 179-182.
- NAKANISHI, S., 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, 258:597-603.

- NAKANISHI, S., R. AXEL Y N.A. SCHNIDER, 1992. Alternative splicing *generates* functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 8552-8556.
- NEWMAN, E. A., 1985. Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature*, 317:809-811.
- PENNER, R., C. FASOLATO Y M. HOTH, 1993. Calcium influx and its control by calcium release. *Curr. Op. Neurobiol.*, 3: 368-374.
- RASMUSSEN, K. E., 1974. The Müller cell: a comparative study of rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye Res.*, 19: 243-257.
- ROBINSON, S.R. Y Z. DREHER, 1990. Müller cells in adult rabbit retinae: morphology, distribution and implications for function and development. *J. Comp. Neurol.*, 292: 178-192.
- SCHNAPF, J.L. Y D.A. BAYLOR, 1987. How photoreceptor cells respond to light. *Sci. American*, 256: 40-47.
- SCHOEPP, D. D. Y P.J. CONN, 1993. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharm. Sci.*, 14: 13-20.
- SCHULMAN, H., 1993. The multifunctional Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinases. *Curr. Op. Cell Biol.*, 5: 247-253.
- SOMOHANO, F., P.J. ROBERTS Y A.M. LÓPEZ-COLOMÉ, 1988. Maturational changes in retinal excitatory amino acid receptors. *Dev. Brain Res.*, 42: 59-67.
- SONNENBERG, J.L., C. MITCHELMORE, P.F. MCGREGOR-LEON, J. HEMPSTEAD, J.L. MORGAN Y T. CURRAN, 1989. Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. *J. Neurosci. Res.*, 24: 72-80.
- STEWART, A., R. BLOOMFIELD Y J. E. DOWLING, 1985. Roles of aspartate and glutamate in synaptic transmission in rabbit retina. II. Inner plexiform layer. *J. Neurophysiol.*, 53: 714-725.
- VERDOORN, T.A., N. BURNASHEV, H. MONYER, P.H. SEEBURG, Y B. SAKMANN, 1991. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science*, 252: 1715-1718.
- WATKINS, J. C., P. KROGSGAARD-LARSEN Y T. HONORÉ, 1990. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends in Pharm. Sci.*, 11: 25-33.
- WILLIAMS, K., C. ROMANO, M.A. DICHTER Y P.B. MOLINOFF, 1991. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci.*, 48: 469-498.
- WISDEN, W. Y P.H. SEEBURG, 1993. Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr. Op. Neurobiol.*, 3: 291-298.
- YOUNG, A.B. Y G.E. FAGG, 1990. Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *Trends Pharm. Sci.*, 11: 126-133.

Trabajo recibido el 18 - 01 - 95 y aceptado el 27 - 02 - 95