

129
Zej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INDUCCION DE FACTORES DE TRANSCRIPCION
MEDIADO POR RECEPTORES A GLUTAMATO EN
CELULAS GLIALES DE MÜLLER DE LA RETINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JANET MURBARTIAN AGUILAR



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

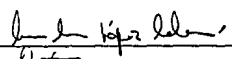
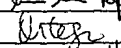
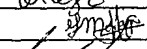
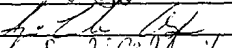
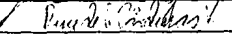
M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realiz^ó la pasante _____
Murbartián Aguilar Janet
con número de cuenta 8955261-2 con el título: _____
Inducción de factores de transcripción mediado por receptores
a glutamato en células gliales de Müller de la retina

Consideramos que reúne _____ los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -
Biólogo .

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

FIRMA

Dra. Ana María López Colomé	
Director de Tesis Dr. Arturo Ortega Soto	
Dra. Genoveva González Morán	
M. en C. Ignacio Camacho Arroyo	
Suplente Dr. Rene de Jesús Cárdenas Vázquez	
Suplente	

Ciudad Universitaria, D.F., a 25 de febrero de 1994

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Ana María López-Colomé en colaboración con el Dr. Arturo Ortega Soto en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Ana María López Colomé y al Dr Arturo Ortega Soto por su asesoría y apoyo en la realización de esta tesis, y a los demás sinodales, la Dra. Genoveva González Morán, el M. en C. Ignacio Camacho Arroyo y al Dr. Rene de Jesús Cárdenas Vázquez por sus sugerencias y críticas a la misma.

Agradezco a todas las personas que de alguna manera me apoyaron en la realización de la tesis, en especial a Juan Manuel Arias Montaña, por su ayuda con las fotografías, los programas de computación y algo más, a Edith por ayudarme en la cuestión de los cultivos y a los compañeros del laboratorio tanto del 223N de Fisiología Celular como al laboratorio 12-23 del CINVESTAV, en especial a Maru, Manolo, Arturo, Clara, Rosy y a Martha Tagle por su amistad sin la cuál este trabajo no hubiese sido igual.

Por último agradezco mucho a mi familia, en especial a mi madre, mi hermana Mildred y mis abuelos, doña Irenita y don Cirilo, por haberme dado esta oportunidad y su apoyo incondicional, y a los cuales está dedicada esta tesis.

ABREVIATURAS

AAE	Aminoácidos excitadores
AMPc	Adenosina 3',5' monofosfato cíclico
AMPA	Acido (s) α -amino-3 hidroxil-5-metil-4-isoxazol propiónico
AP-1	Proteína activadora 1
AP3	Acido 2-amino-3-fosfonopropiónico
L-AP4	Acido L-2-amino-4-fosfonobutírico
AP5	Acido DL-2-amino-5-fosfonopentanoico
APV	D-(-)-2 amino-5-fosfonovalerato.
Asp	Acido aspártico
CaM	Calmodulina
7-Cl-Kyn	7-cloro-quinurenato
CNQX	L-6-cloro-7-nitroquinoxalina-2,3 diona
CPP	Acido 3-((t)-2-carboxipiperazin-4-il) propil -1-fosfónico
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CREB	Proteína que se une al elemento de respuesta a AMPc
DG	Diácil glicerol
DIV	Días <i>in vitro</i>
DNQX	6,7-dinitroquinoxalina-2,3- diona
GABA	Acido gama amino butírico
GAD	Glutamato descarboxilasa
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glia
GGF	Factor de crecimiento glial
Gly	Glicina
Glu	Acido glutámico
GMPC	Guanosin monofosfato cíclico
5-HT	5- Hidroxitriptamina
5-HPCA	Acido 3-hidroxil-4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo [5,4-c]-piridina-5-carboxílico
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
KA	Kainato
KBP	Proteína que une kainato
MK-801	(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo (a,d) ciclohepten-5,10-iminomaleato
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Acido cis-2,3 piperidina descarboxílico
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIP2	Fosfatidil inositol-4,5, bifosfato
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína cinasa dependiente de Ca ²⁺ /DG
PKCa ²⁺ /CaM	Proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina
PLA2	Fosfolipasa A ₂
Quis	Acido quisquálico
SRE	Elemento de respuesta a suero

SRF	Factor de respuesta a suero
tACPD	Acido trans -1-amino-ciclopentil-1,3-dicarboxílico
TEA	Tetraetil amonio
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TPA	Acetato de tetradecanoil-forbol
TTX	Tretodotoxina
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	1
ABREVIATURAS	ii
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
1. ORGANIZACION GENERAL DE LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS	2
a. Morfología	2
b. Fisiología	3
2. NEUROTRANSMISORES EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS	6
3. FUNCION DE LA GLIA EN EL SISTEMA NERVIOSO	10
a. Tipos de células gliales	10
b. Funciones generales de las células gliales	10
c. Canales iónicos en células gliales	12
d. Receptores a neurotransmisores en glia	13
4. GLIA DE LA RETINA	17
a. Astrocitos	17
b. Células de Müller	17
5. CLASIFICACION DE LOS RECEPTORES DE AMINO-ACIDOS EXCITADORES (AAE)	20
a. Receptores ionotrópicos	21
1. Receptor NMDA	22
2. Receptor AMPA	23
3. Receptor KA	24
4. Receptor L-AP4	24
b. Receptores metabotrópicos	25

6. BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES A AAE	25
a. Biología molecular de los receptores ionotrópicos	25
1. Receptor NMDA	25
2. Receptores No-NMDA	27
i. Receptor AMPA	28
ii. Receptor KA	32
b. Biología molecular de los receptores metabotrópicos	35
7. EFECTOS A LARGO PLAZO POR LA ACTIVACION DE LOS RECEPTORES A AAE	36
a. Genes tempranos y factores de transcripción	37
b. Segundos mensajeros y la activación de genes tempranos mediados por la activación de receptores a glutamato	39
III. ANTECEDENTES	41
1. RECEPTORES A AAE EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS	41
2. RECEPTORES A AAE EN LA GLIA DE LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS	42
IV. OBJETIVO	44
V. MATERIALES Y METODOS	45
1. Materiales	45
2. Cultivos primarios de células de glía de Müller de retina de pollo.	45
3. Mini-extractos nucleares	46
4. Marcaje de oligonucleótidos de doble cadena	47
5. Ensayo de retardo de entrada al gel	48
VI. RESULTADOS	50
VII. DISCUSION	62
VIII. BIBLIOGRAFIA	67

I. RESUMEN

Las células de Müller pertenecen a la glia radial (Bartlett et al., 1981), se encuentran a todo lo largo de la retina de los vertebrados (Robinson y Dreher, 1990) y frecuentemente están en íntima asociación con las células neurales de la retina, donde se sabe que el glutamato (Glu) es uno de los neurotransmisores más importantes (Steward et al., 1985). Las células de Müller presentan receptores a aminoácidos excitadores (López-Colomé y Romo-de-Vivar, 1991) que al ser activados forman cascadas de segundos mensajeros (López-Colomé et al., 1993), lo que da pauta a sugerir que pueden presentar respuestas a largo plazo (Vogt y Bos, 1989). Los resultados obtenidos indican que la activación de los receptores a Glu del tipo ionotrópico en células gliales de Müller induce la formación del factor de transcripción AP-1 (Morgan y Curran, 1991), en una forma dependiente de la dosis, teniendo el siguiente orden de potencia en su respuesta: NMDA > Glu > KA > AMPA > Quis; el tiempo óptimo de estimulación fue de una hora y manteniéndose constante hasta dos horas, a excepción de la activación dada con AMPA, donde sólo se obtuvo respuesta a tiempos muy cortos; la respuesta disminuyó cuando se aplicaron los antagonistas CPP y CNQX antes de los agonistas, por lo que se puede concluir que la respuesta que se observó fue dada de manera específica por la activación de receptores a Glu; estos resultados permiten sugerir que las células de Müller son capaces de responder de manera específica tanto a corto como a largo plazo a estímulos que existen en el ambiente en que se encuentran en la retina.

II. INTRODUCCION

1. ORGANIZACION GENERAL DE LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS

a. MORFOLOGIA

La retina de vertebrados debido a su organización laminar y a que está constituida por relativamente pocos tipos celulares, representa un buen modelo para estudiar al sistema nervioso central (SNC) (Farber y Adler, 1986). La retina es la capa interna de la pared del globo ocular, adyacente al epitelio pigmentado; está constituida por cinco tipos de células neurales: los fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares, las células ganglionales, las células horizontales y las células amacrinas, y por dos subtipos de células gliales: las células de Müller, las cuales atraviesan a todo lo largo de la retina y los astrocitos (Newman, 1985) (figura 1).

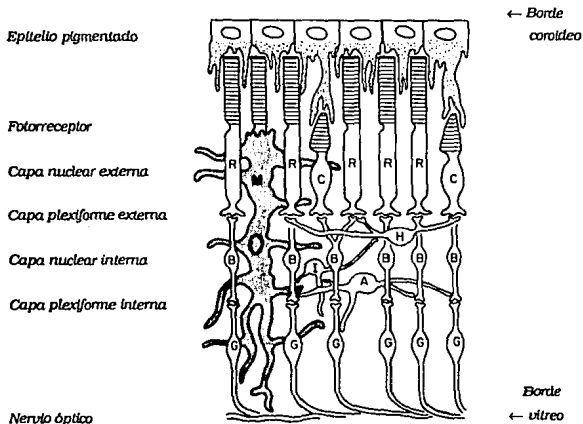


Figura 1. Diagrama de las capas de la retina de vertebrado y sus relaciones sinápticas. C, conos; R, bastones; H, células horizontales; B, células bipolares; A, células amacrinas; G, células ganglionales y M, células de Müller (Farber y Adler, 1986).

En la retina se pueden observar dos capas en las que se establecen relaciones sinápticas: la capa plexiforme externa (fotorreceptores, células bipolares y células horizontales) y la capa plexiforme interna (células bipolares, amacrinas y ganglionales), entre estas dos capas se localiza la capa nuclear interna (Dowling, 1970) (figura 1).

En los fotorreceptores se pueden distinguir dos regiones: el segmento externo, el cual contiene los pigmentos que absorben a diferentes longitudes de onda de la luz, y el segmento interno, el cual contiene los organelos subcelulares y tiene terminales sinápticas que conectan con células horizontales y bipolares. El segmento externo de los bastones contiene el pigmento rodopsina que absorbe la luz a una longitud de onda de 500 nm, y es responsable de la percepción de luz-obscuridad. Los conos son las células responsables de la visión en color; existen varios tipos de conos, cada uno de los cuales contienen un pigmento que absorbe a diferente longitud de onda (Nathans, 1987). Las células bipolares son la vía vertical que transmiten 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 ganglionales corren sobre la superficie interna de la retina para converger en un punto y formar el nervio óptico, en este sitio no existen células neurosensoriales, por lo que representa un punto ciego del campo visual (Dowling, 1970).

b. FISILOGIA DE LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS

La respuesta visual se inicia cuando la luz isomeriza el grupo 11-*cis*-retinal de la rodopsina a todo-*trans* retinal (Wald, 1968). En la membrana del segmento externo de los fotorreceptores existen canales de sodio constantemente activados por GMPc en la obscuridad, los iones sodio fluyen hacia adentro del segmento externo debido al gradiente electroquímico de sodio que existe, este gradiente es mantenido por la bomba ATPasa de Na⁺-K⁺ localizada en el segmento interno; cuando existe un estímulo luminoso, la luz induce cambios en la permeabilidad de la membrana del segmento externo del

fotorreceptor, una vez que la rodopsina es fotoexcitada, es capaz de activar a la transducina (miembro de la familia de proteínas G) y ésta a su vez, activar a una fosofodiesterasa la cual hidroliza GMPc, al bajar la concentración de GMPc, los canales de sodio activados por éste, se cierran y da por resultado la hiperpolarización de la membrana del fotorreceptor, constituyendo el primer paso en el proceso visual (Schnapf, 1987) (figura 2).

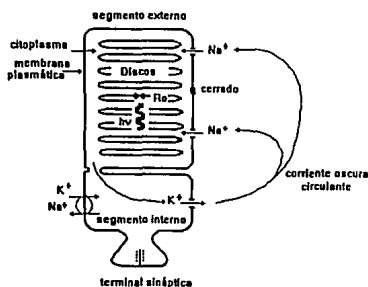


Figura 2. Diagrama de un bastón. En la obscuridad existe una corriente de Na^+ dada por canales de Na^+ activados por GMPc. La luz activa al fotopigmento rodopsina (Ro^*) e induce que los canales de Na^+ activados en la obscuridad se cierren, decreciendo el flujo de Na^+ . (Lamb, 1986).

Por técnicas electrofisiológicas se demostró que existen dos tipos de células bipolares, unas que se hiperpolarizan y otras que se despolarizan en respuesta a la estimulación por luz. Las células bipolares que se despolarizan (D) están conectadas a células ganglionales ON, mientras que las células bipolares que se hiperpolarizan (H) activan células ganglionales OFF, células ganglionales ON-OFF reciben información de ambos tipos de células bipolares. La nomenclatura ON y OFF corresponde al tipo de campo receptivo de las células ganglionales que se active. El campo receptivo de una simple unidad, es el área de la retina en la que, al recibir un estímulo luminoso, causa una descarga eléctrica en una célula ganglional a la cual está funcionalmente conectada. En todos los campos receptivos existe una región central que da un

patrón de descarga eléctrica opuesto al que se obtiene en la periferia; siendo una célula ON si se despolariza u OFF si se hiperpolariza ante un estímulo luminoso, el centro puede ser OFF y la periferia ON y viceversa (Kuffler, 1953, Hubel y Wiesel, 1960).

En la capa plexiforme externa de la retina las interacciones sinápticas son potenciales graduados, en la capa plexiforme interna la información que dan las células bipolares a las ganglionales también es graduada, mientras que las células ganglionales y algunas células amacrinas generan potenciales de acción que son transmitidos al núcleo del geniculado lateral en el tálamo, donde la segregación de la información de los dos canales ON y OFF aún se conserva, incluso, hasta la corteza visual primaria (Stone, 1983).

La vía vertical de los fotorreceptores a células bipolares y de éstas a las células ganglionales no está aislada, existen dos tipos de interacciones laterales: en la capa plexiforme externa por las células horizontales y las células amacrinas en la capa plexiforme interna.

Las células horizontales reciben información de varios conos y bastones y hacen sinapsis con células bipolares adyacentes o sobre otras células horizontales mediante uniones comunicantes, debido a que no se han observado sinapsis con fotorreceptores, se supone que las interacciones laterales mediadas por las células horizontales sólo actúan sobre las dendritas de las células bipolares, sin embargo, por estudios de microscopía se propone que la interacción entre células bipolares y horizontales ocurre en las invaginaciones del receptor, lo cual podría sugerir que no sólo las dendritas de las células bipolares son directamente activadas por los fotorreceptores, sino que también existe una influencia a las células horizontales adyacentes (Dowling, 1970); la función de las células horizontales es la de hiperpolarizar a las vías que se encuentran alrededor de una vía ON despolarizante, formando parte de la región OFF de alrededor, o por el contrario, puede contribuir a un alrededor ON de un centro OFF (Wassle y Boycott, 1991).

Se han descrito diferentes tipos de células amacrinas, estableciéndose que las diferentes formas celulares corresponden a distintas unidades

funcionales. El hecho de que exista una gran variedad de ellas hace posible que se puedan crear conexiones específicas con células ganglionales. Se ha visto que las células amacrinas extienden sus dendritas a la capa plexiforme interna, donde justamente hacen sinapsis con las células ganglionales. La mayoría de las células amacrinas posee campos receptivos con una organización centro ON u OFF, y son capaces de generar potenciales de acción. Un primer grupo de células amacrinas en las que se encuentran las llamadas AII, modulan la respuesta que les llega de las células bipolares estimuladas por bastones a las células ganglionales, funcionando como un puente de comunicación celular entre ellas, debido a que no existe un contacto directo entre esas células (Masland, 1988). Un segundo grupo lo constituyen células amacrinas que extienden sus dendritas largas distancias a través de la retina, tienen una densidad baja y tienen funciones reguladoras no específicas, ya que una sola célula amacrina puede hacer sinapsis con un gran número de células ganglionales. Existe otro grupo heterogéneo de células amacrinas que aún no se han definido bien sus características pero que parecen estar involucradas en la tarea de la adaptación a la oscuridad (Masland, 1988).

2. NEUROTRANSMISORES EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS.

Para muchos de los subtipos neurales de la retina se ha descrito que sólo actúa un tipo de neurotransmisor, sin embargo, para otros subtipos celulares se han descrito varios tipos de neurotransmisores; esta información se ha obtenido de estudios farmacológicos usando agonistas y antagonistas del transmisor involucrado (Daw et al., 1989).

Los fotorreceptores en la oscuridad se encuentran parcialmente despolarizados y existe un flujo continuo de neurotransmisor sobre las células bipolares y horizontales adyacentes. Cuando incide la luz, la membrana del fotorreceptor 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 glutámico (Glu) y el ácido aspártico (Asp) (Steward, Bloomfield y Dowling, 1985).

En la retina del ajolote, un análogo del ácido glutámico, el ácido L-2-amino-4-fosfobutírico (L-AP4), en concentraciones micromolares es capaz de bloquear de manera específica células bipolares de la vía ON, sin afectar la vía OFF y a otras neuronas que no dependen de la despolarización de la célula bipolar (Slaughter y Miller, 1981).

Steward y colaboradores (1985), haciendo registros electrofisiológicos intracelulares y estudios farmacológicos en retinas aisladas de conejo, mostraron que el Asp y el Glu mimetizan la acción del transmisor de los fotorreceptores sobre neuronas de la capa plexiforme externa, células bipolares y células horizontales. Al usar análogos del Glu, el kainato (KA) y el ácido quisquálico (Quis), encontraron que también mimetizan la acción del neurotransmisor endógeno, mientras que los antagonistas α -metil glutamato, α -amino adipato y el diéster de glutamato, muestran una débil inhibición sobre el efecto del fototransmisor a las neuronas de la capa plexiforme externa (Steward et al., 1985).

Los aminoácidos excitadores parecen estar involucrados como transmisores en algunos tipos de células amacrinas y en células ganglionales estudiadas en retina de conejo, donde tanto el L- aspartato (L-Asp) como el L- glutamato (L-Glu), muestran una acción excitadora sobre la actividad de estas células, siendo más fuerte el efecto del KA y Quis ya que se requiere de ellos concentraciones 200 veces menores que del Glu (Steward et al., 1985). 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. Aminoácidos excitadores también actúan directamente sobre células ganglionales y muchas células amacrinas (Daw et al., 1989).

La inhibición lateral que se observa dada 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 γ -amino butírico (GABA) y la glicina (Gly) (Brandon, 1985).

Para identificar neuronas de la retina que usan al GABA como neurotransmisor, Brandon (1985), usando técnicas de inmunocitoquímica y a la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) como marcador (debido a que es la enzima responsable del último paso de la biosíntesis del GABA), encontró que, en todas las especies de vertebrados estudiadas (desde teleosteos hasta primates), la GAD estaba presente en la capa plexiforme interna y por medio de microscopía electrónica se pudieron identificar seis tipos de células amacrinas con esta característica. No en todas las especies estudiadas se encontró inmunorreactividad de la GAD, sólo en células horizontales H-1 (las cuales se hiperpolarizan en respuesta a la luz roja) de peces, tortugas y pollos (Brandon, 1985). En vertebrados superiores, sólo una población de células horizontales se ha descrito que contienen GABA como transmisor (Chun y Wassle, 1989).

En la oscuridad, las células horizontales en su estado despolarizado continuamente liberan GABA, el cual tiende a hiperpolarizar la terminal del fotorreceptor; cuando existe un estímulo luminoso, las células horizontales comienzan a hiperpolarizarse y dejan de liberar GABA, el fotorreceptor que recibía el transmisor de esas células comienza a despolarizarse y a liberar Glu, que a su vez, hiperpolariza a las células bipolares H o centro OFF que se encuentran en la periferia de las células bipolares ON, por lo tanto, la iluminación difusa que le llega a la región periférica del campo receptivo antagoniza el efecto de la luz brillante en el grupo central de fotorreceptores centro ON (Wassle y Boycott, 1991).

Existen varios tipos de células amacrinas, todas ellas con diferentes formas, neurotransmisores y funciones. Varios tipos de células amacrinas presentan inmunorreactividad a GAD, confirmando de esta manera que son células GABAérgicas (Brandon, 1985). Otro tipo de células amacrinas utilizan como neurotransmisor a la Gly, las llamadas AII son las mejor estudiadas, ellas reciben información de células bipolares estimuladas por bastones; las células amacrinas AII hace sinapsis eléctricas por medio de las uniones

comunicantes con células bipolares de la vía ON en la mitad de la capa plexiforme interna y en la parte externa de la capa plexiforme interna, sinapsis química con células bipolares de la vía OFF, de esta manera modula la mutua inhibición entre la vía ON y la vía OFF (Wassle y Boycott, 1991).

La dopamina es la principal catecolamina encontrada en la retina de vertebrados, por medio de estudios de autorradiografía se identificó que la acumulación de [³H] dopamina estaba en la capa nuclear interna y en la capa plexiforme interna y que corresponde a células amacrinas (Pourcho, 1982). Poco se sabe de su función, pero se les ha identificado junto con células amacrinas que usan somatostatina y sustancia P, en la adaptación a la oscuridad (Masland, 1988).

Así también, por medio de métodos autorradiográficos, se encontró que células amacrinas de retina de pollo eran capaces de capturar colina y sintetizar acetilcolina (Baughman, 1977). Células amacrinas colinérgicas también presentan inmunoreactividad para el GABA, lo cual sugiere que un solo tipo celular es capaz de realizar funciones inhibitorias y excitadoras sobre una misma célula, esta propiedad daría la información a las células ganglionales para la dirección selectiva del movimiento (Wassle y Boycott, 1991, Brecha et al., 1988).

3. FUNCION DE LA GLIA EN EL SISTEMA NERVIOSO

a. TIPOS DE CELULAS GLIALES

Tanto neuronas como células gliales en el cerebro de los mamíferos derivan de neuroepitelio del tubo neural primitivo. Por su origen ontogenético, la glía se clasifica en: microglía de origen mesodérmico y la macroglía de origen ectodérmico que incluye a tres familias, astrocitos tipo 1, astrocitos tipo 2 y los oligodendrocitos (Cameron y Raktic, 1991).

Los astrocitos tipo 1, son inmunopositivos para la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), proteína específica de los filamentos intermedios de astrocitos, inmunopositivos para la fibronectina, la laminina y al anticuerpo Ran2, son células polimórficas que se encuentran predominantemente en

materia gris. De los astrocitos tipo 1 deriva la glia radial. La glia radial se caracteriza por una forma alargada y que durante el desarrollo de la corteza cerebral se extienden en la pared cerebral, del ventrículo a la superficie pial; dentro de la glia radial se incluyen a las células endociliales, células gliales de Bergmann en el cerebelo y las células de Müller en la retina (Bartlett et al., 1981).

Los astrocitos tipo 2 y los oligodendrocitos derivan del mismo progenitor, las células O-2A. Los astrocitos tipo 2, son inmunopositivos a la GFAP y al anticuerpo A2B5 y negativos al anticuerpo Ran2; se encuentran predominantemente en materia blanca y probablemente sean los llamados astrocitos fibrosos. Por último, los oligodendrocitos se identifican inmunohistoquímicamente al detectar el antígeno O4 y la presencia del galatocerebroside GalC. El estado maduro de los oligodendrocitos se indica por la aparición de glicoproteínas asociadas a mielina y la proteína mielínica básica (Gard y Pfeiffer, 1989).

b. FUNCIONES GENERALES DE LAS CELULAS GLIALES

Hallazgos recientes indican que las células gliales, aunque no son capaces de generar potenciales de acción, debido a que su potencial de membrana es muy electronegativo, realizan muchas más funciones de las que se pensaba hace tiempo y que modulan la actividad neural. El potencial de membrana de las células gliales es alrededor de -75 mV y está determinado por el potencial de equilibrio del K^+ , ya que presenta una alta y selectiva permeabilidad por este ión y una baja permeabilidad al Na^+ . Las células gliales pueden responder a las actividades neuronales; impulsos nerviosos causan una lenta despolarización de las células gliales adyacentes, debido a que durante la actividad neural se acumula K^+ en el espacio intersináptico y éste es capaz de despolarizar a la membrana de las células gliales cercanas que poseen una alta conductancia al K^+ (Orkand, 1966); gracias a su alta conductancia al K^+ , los astrocitos tienen la función de ser un sistema amortiguador de las concentraciones de K^+ en el medio extracelular,

capturando de las regiones con una alta concentración y liberándolo en regiones distales, donde la concentración del ión es menor (Orkand, 1966).

Las células gliales tienen sistemas de captura de neurotransmisores. En cultivos primarios de cerebro de rata, por medio de autorradiografía se detectó la captura de $[^3\text{H}]$ serotonina en astrocitos, la cual era sensible a la omisión de Na^+ en el medio, siendo el sistema de captura de serotonina de alta afinidad y dependiente de Na^+ (Kimelberg, 1985).

Presentan también, un sistema de captura de Glu, en el cual, la captura de un Glu se acompaña de dos Na^+ y por el antitransporte de un K^+ y un $-\text{OH}$ o bien un HCO_3^- . *In vivo*, la captura del Glu genera la alcalinización del medio extracelular y la acidificación intracelular, por lo que de manera indirecta, las células gliales pueden regular los cambios extracelulares de pH inducidos por la actividad neural (Bouvier et al., 1992). La regulación del pH por las células gliales también se confirma por la presencia de la anhidrasa carbónica C en astrocitos y oligodendrocitos, enzima responsable de regular el estado ácido-base mediante la conversión de CO_2 a HCO_3^- (Roussel, 1979).

Otra consecuencia de la captura del Glu por las células gliales, es que mantiene niveles bajos de Glu en el medio extracelular, que no son tóxicos para las células (Choi, 1988). Una vez que es capturado el Glu, la glia posee la enzima glutamina sintetasa (Norenberg, 1979), para transformar el Glu a glutamina, que puede ser liberada y capturada por neuronas glutamaérgicas y gabaérgicas, ya que la glutamina es el precursor para la síntesis de Glu y GABA (Hertz, 1986).

Las células gliales pueden liberar factores tróficos como resultado de estímulos dados por las neuronas: factor de crecimiento glial (GGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factor de crecimiento fibroblástico (LoPachin, 1993), además de esteroides (Kabbadj, 1993), péptidos, proteínglucanos (Dow et al., 1993), eicosanoides y moléculas que forman parte de la matriz extracelular.

Los astrocitos junto con células endoteliales de los capilares, constituyen un sistema de protección del SNC formando parte de la llamada

barrera hematoencefálica, incluso, se ha propuesto que los astrocitos inducen a células endoteliales no neurales a formar capilares delgados para formar la barrera hematoencefálica (Janzer y Raff, 1987). Así también, por estar en contacto con capilares sanguíneos se ha visto que tienen un papel importante en la regulación del suministro de sustancias metabólicas a las neuronas. (Bonilla, 1985).

La microglía son células de tamaño pequeño y se encuentran en la vecindad de capilares sanguíneos. Cuando se produce un daño en el SNC, la microglía reactiva prolifera y emigra al área lesionada, no se sabe bien su función, pero se postula que desempeñan una función macrófaga digiriendo el tejido nervioso dañado (Thomas, 1992).

Los oligodendrocitos son los responsables de la formación de mielina de los axones en el SNC, mientras que las células de Schwann forman la mielina de los axones en el SNP; también, se han identificado astrocitos tipo 2 especializados en procesos de mielinización (French-Constant y Raff, 1986).

c. CANALES IONICOS EN LAS CELULAS GLIALES

Muchos de lo que se conoce actualmente sobre los canales iónicos de las células gliales se ha obtenido de estudios bioquímicos y electrofisiológicos hechos en cultivos celulares primarios. En los astrocitos tipo 1 se han descrito corrientes de sodio, calcio, potasio y cloro (Bevan, 1990). Sólo se han descrito canales iónicos dependientes de voltaje en glia, en particular cuatro tipos de canales de K^+ : canales de K^+ de corriente rectificante ($I_{K(IR)}$), que abren a potenciales de membrana de reposo (-80 mV) y que permiten la entrada de iones que contrarresten el movimiento del ión K^+ al exterior, por lo tanto son los responsables de la conductancia en reposo de las células gliales (Bevan, 1990); Corriente rectificante retardada (I_K), se activan cuando la célula se despolariza a más de -40 mV y son de lenta inactivación, se bloquean con tetracetilamonio (TEA); canales de K^+ I_A , se activan a potenciales más negativos y se inactivan rápidamente (10 milisegundos), son sensibles al bloqueo por 4-aminopiridina (4-AP), por último, canales de K^+ que se activan por elevación de

concentraciones internas de calcio ($I_{K(Ca)}$) (Bevan, 1990).

In vitro, se han descrito en glia canales de calcio dependientes de voltaje: canales de Ca^{2+} tipo transiente ($I_{Ca(T)}$), se activa al despolarizarse la membrana a -60 mV y tiene una inactivación rápida y canales de Ca^{2+} que se activan a -30 mV y se inactivan lentamente ($I_{Ca(L)}$). Canales de Cl^- y de Na^+ dependientes de voltaje también se han descrito en células gliales, aunque su densidad es muy baja, se activan cuando la membrana se despolariza a más de -30 mV, de hecho, los canales de Na^+ son muy similares a los descritos en neuronas y son sensibles al bloqueo por tetrodotoxina (TTX) (Barres, 1991, Bevan, 1990).

En general, la densidad de canales de K^+ en células gliales es similar a las neuronas, sin embargo, la densidad de canales de Na^+ y canales de Ca^{2+} en glia es mucho menor que en neuronas (Barres, 1991).

Mediante una nueva técnica desarrollada por Barres y colaboradores (1990), llamada "Impresión de tejidos" han logrado dilucidar los tipos de canales iónicos y las características que presentan *in vivo* las células gliales, esta técnica permite que las células que se adhirieron a una membrana de nitrocelulosa y que se disociaron enzimáticamente conserven las características *in situ* de sus prolongaciones, haciéndolas accesibles para su estudio con técnicas de inmunocitoquímica y patch-clamp; prácticamente, casi todos los canales iónicos descritos *in vitro* se han identificado *in vivo*, en astrocitos tipo 1 se encontraron dos corrientes de K^+ dependientes de voltaje: $I_{K(IR)}$ de 470 pA y otra de 130 pA I_K , una corriente de Na^+ sensible a TTX y no se encontraron corrientes de Ca^{2+} tipo L (Barres et al., 1990).

d. RECEPTORES A NEUROTRANSMISORES EN GLIA

Mediante una gran variedad de técnicas experimentales en las que se incluyen registros electrofisiológicos, unión del ligando a su receptor y estudios bioquímicos de los segundos mensajeros que se inducen cuando se activa el receptor, se ha podido dilucidar la presencia de receptores a transmisores en células gliales; para hacer los estudios antes mencionados, por lo general, se utilizan cultivos primarios de células gliales (Murphy, 1987).

Existe evidencia de que astrocitos poseen receptores a noradrenalina, tanto del subtipo α como β (Ebersolt, 1981), Hösl y colaboradores (1982), observaron que la noradrenalina despolariza de manera dosis dependiente a la membrana de astrocitos en cultivo, así también tanto la fenilefrina, un agonista del receptor tipo α_1 , como la clonidina un agonista de receptor tipo α_2 despolarizan a gran número de células gliales; cuando utilizaron un antagonista de los receptores α adrenérgicos, la fentolamina, observaron que era capaz de bloquear la despolarización producida por la adrenalina. Por otro lado, al utilizar isoprenalina, un agonista de los receptores adrenérgicos tipo β observaron una hiperpolarización de la membrana de astrocitos, efecto que se bloqueó con el atenolol, antagonista a este tipo de receptor (Hösl et al., 1982).

En cultivos primarios de astrocitos existe evidencia de receptores a acetilcolina de tipo muscarínico ya que presentaron unión a [3 H] quinuclidinilbenzilate, un agonista de este tipo de receptor colinérgico (Repke, 1982). Receptores a histamina y a 5-hidroxitriptamina (5-HT) también se han descrito en astrocitos, en algunos casos se ha reportado que la activación de receptores a 5-HT inducen la hidrólisis de fosfatidil inositol y en algunos otros estimulan la producción de AMPc (Murphy, 1987). Hansson y colaboradores (1984), reportan la existencia de receptores dopaminérgicos en cultivos de astrocitos que incrementan de manera dosis dependiente el nivel de AMPc intracelular, y que existe una interacción entre el receptor a dopamina con el receptor B adrenérgico en la elevación del nivel de AMPc en este tipo celular (Hansson et al., 1984).

Canales iónicos que se abren por GABA y permiten una corriente de Cl⁻ han sido descritos en astrocitos (Kettenmann et al., 1987). El GABA induce una respuesta dependiente de la dosis en cultivos de astrocitos; cuando se dió un pulso de GABA en un intervalo de tiempo menor de un minuto a uno anterior, no se presentó una segunda respuesta a GABA, lo que indica que el receptor a GABA se desensibilizó. Al utilizar muscimol, un agonista del subtipo de receptor GABA_A se obtuvo una respuesta similar a la del GABA, mientras

que el baclofen, un agonista del subtipo de receptor GABA_B no alteró el potencial de membrana de los astrocitos; antagonistas del receptor GABA_A, picrotoxina y bicuculina, reducen la respuesta al GABA en más del 90%, lo que indica la especificidad del receptor (Kettenmann y Schachner, 1985).

El Glu induce corriente iónicas tanto en astrocitos tipo 1 como en los tipo 2. En cultivos primarios de astrocitos tipo 2, los receptores a Glu activados por Glu y sus agonistas, Quis y KA, inducen conductancias iónicas similares a las descritas en neuronas (Usovics, 1989); el Glu y aspartato producen una despolarización de la membrana de astrocitos tipo 2 de manera dosis dependiente, el efecto fue menor con KA y Quis; cuando se colocó GABA y Glu a estas células gliales el efecto de despolarización de la membrana fue aditivo, lo que indica que son dos mecanismos distintos que pueden interferir uno con otro (Kettenmann y Schachner, 1985).

En cultivo de células gliales de cerebelo de rata, por medio de patch clamp, se observó que, el Glu, Quis, AMPA (ácido (s)-α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) y KA producen una corriente entrante en astrocitos tipo 2; Asp y NMDA no producen ninguna respuesta en esta células, aún en presencia de Gly y sin Mg²⁺ libre. En astrocitos tipo 1, Quis, KA y NMDA producen una corriente detectable a los 7 días *in vitro* (DIV) (Wyllie, 1991). Al utilizar análisis de imágenes de fluorescencia y el indicador fluorescente de calcio fluo-3 Jensen y Chiu (1991), detectaron cambios intracelulares de Ca²⁺ producidos por la activación de receptores a Glu en células gliales de corteza cerebral de rata; en astrocitos identificados como tipo 2, presentaron una elevación lenta y sostenida en la concentración de Ca²⁺ intracelular inducida por agonistas del receptor a Glu de tipo ionotrópico, AMPA y KA, y se inhibió el efecto por la adición de CNQX (L-6-clano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona), este efecto fue dependiente del calcio extracelular; los astrocitos tipo 1 presentaron un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular de manera rápida y transiente, el efecto del AMPA, KA y CNQX en ésta células fue menor que en astrocitos tipo 2 y no dependían de la concentración externa de calcio. En ambos tipos celulares presentaron una

corriente entrante de Na^+ , aunque mayor en astrocitos tipo 2, este incremento fue reducido por CNQX, lo que sugiere que el incremento de Ca^{2+} intracelular fue mediado, al menos en parte por receptores a Glu ionotrópicos (Jensen y Chiu, 1991). Por último, también existe evidencia de receptores para péptidos, hormonas y opioides en cultivos primarios de astrocitos (Murphy, 1987).

Los efectos inmediatos de la activación del receptor en astrocitos, al igual que en otros tipos celulares son: una alteración en el flujo de iones y la generación de segundos mensajeros como el adenosin monofosfato ciclico (AMPC), inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DG). En astrocitos, la activación de receptores adrenérgicos α_1 y α_2 , receptor a histamina H_1 y receptores a Glu y GABA, inducen despolarización de la membrana, mientras que, el receptor β adrenérgico, el receptor a histamina H_2 , y el receptor 5-HT producen una hiperpolarización de la membrana de astrocitos (Murphy, 1987).

En cultivos de astrocitos de corteza cerebral de rata, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la secretina y el isoproterenol (agonista del receptor β adrenérgico), inducen una acumulación AMPC en éstas células; la norepinefrina y epinefrina, agonistas del receptor adrenérgico α_2 , inhiben la acumulación de AMPC inducida por isoproterenol (Evans, 1984). Los receptores a glucagon, histamina H_2 y prostaglandinas, también activan a la adenilato ciclasa, mientras que, adenosina A_2 y melatonina inhiben la actividad de la enzima (Murphy, 1987).

La activación del receptor colinérgico de tipo muscarínico y del receptor adrenérgico α_1 inducen la acumulación de inositol fosfato; astrocitos incubados con [^3H] myo-inositol, en presencia de los agonistas carbacol y noradrenalina inducen la acumulación de inositol fosfato, el efecto fue inhibido por los antagonistas prazosina y atropina respectivamente (Pearce et al., 1985); los tipos de inositol fosfato que se acumulan por el efecto de la noradrenalina y el carbacol en los astrocitos corresponden a IP_3 en mayor proporción a inositol bifosfato (IP_2) e inositol monofosfato (IP_1), también se ha

visto, que en este caso, se requiere de Ca^{2+} extracelular, ya que al quitar el Ca^{2+} extracelular con EGTA, la acumulación de inositol fosfato producida por estos agonistas, disminuye (Pearce, 1986). Otros receptores que están involucrados en la hidrólisis de fosfolinosídeos de membrana son, el receptor a histamina, 5-HT (Murphy, 1987) y algunos receptores a Glu (Jensen, 1991).

4. GLIA DE LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS

a. ASTROCITOS

Por estudios de microscopía se han identificado dos tipos de células gliales en la retina de vertebrados: las células de Müller y las células gliales astrocíticas, éstas últimas sólo si las retinas son vascularizadas (Rasmussen, 1974). Los astrocitos son células pequeñas que se encuentran en la capa interna de la retina y en número elevado cerca del disco óptico. El núcleo de los astrocitos de la retina se localiza entre los axones de la capa de fibras nerviosas; por medio de microscopía electrónica se puede ver que el núcleo de los astrocitos tiene una apariencia granulosa fina y la cromatina se encuentra distribuida de manera homogénea, los filamentos se localizan separadamente en el citoplasma; se han identificado contactos intercelulares entre las prolongaciones de los astrocitos del tipo de las uniones comunicantes. En la porción intraocular del nervio óptico, la astroglia forma la glia limitante que separa el nervio óptico del cuerpo vítreo y es la responsable de formar la llamada barrera hematoencefálica en la retina en la porción intraocular del nervio óptico (Bussow, 1980).

b. CELULAS DE MÜLLER

Las células de Müller son una forma especializada de los astrocitos tipo 1, son inmunopositivas para la GFAP (Bignami, 1984) y constituyen el elemento glial más abundante de la retina de los vertebrados (Bussow, 1980) (Figura 3). Las células de Müller se orientan radialmente a lo largo de la retina, desde la capa de los fotorreceptores hasta la capa de células ganglionales. Son células bipolares y su núcleo está a nivel de la capa nuclear interna, en esta

capa se ha visto que las células de Müller envuelven parcialmente neuronas adyacentes, mientras que, en la capa nuclear externa y en la capa de las células ganglionales las envuelve totalmente (Robinson y Dreher, 1990). El papel de las células de Müller en estas capas no se conoce, se propone que provean a las neuronas adyacentes nutrientes, tal como el glucógeno, particularmente en retinas avasculares (Bussow, 1980). Estudios inmunohistoquímicos han mostrado que numerosas prolongaciones de las células de Müller se extienden lateralmente a través de las capas plexiformes y frecuentemente están en íntima asociación con las dendritas neurales y sinapsis (Robinson y Dreher, 1990).

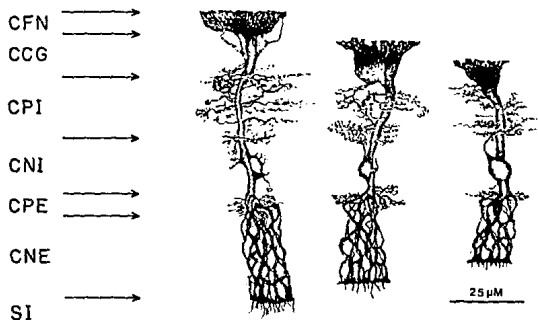


Figura 3. Dibujos en cámara lúcida de células de Müller y su ubicación respecto a las diferentes capas de la retina. CFN, capa de fibras nerviosas; CCG, capas de células ganglionales; CPI, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa; SI, segmento interno del fotorreceptor (Robinson y Dreher, 1990).

Existe un acople lateral entre las células de Müller mediante uniones comunicantes; en retina de ajolote, al inyectar luciferina dentro de una célula de Müller la fluorescencia después de un tiempo se encontró difundida en las

células de Müller que rodeaban a la célula inyectada, lo cual sugiere que existe un mecanismo de comunicación entre ellas (Mobbs, 1988); estas comunicaciones también han sido confirmadas por microscopía electrónica (Bussow, 1980).

No se distinguen diferencias morfológicas significativas entre células de Müller de diferentes retinas vascularizadas y avasculares (Rasmussen, 1974). El potencial de membrana de las células de Müller varía muy poco según las especies, pero es alrededor de -80 mV y está dado por la concentración externa de K^+ ya que tiene una alta permeabilidad a este ión, y la permeabilidad al Na^+ es muy pequeña (Newman, 1985), por tener un potencial de membrana tan electronegativo, las células de Müller no pueden generar potenciales de acción por lo que se les consideraba hace tiempo eléctricamente inexcitables (Conner et al., 1985).

En las células de Müller, la conductancia al K^+ no es uniforme en toda la célula. El exceso de K^+ producido por la actividad neural de la retina es capturado por las células de Müller y la salida de este ión ocurre principalmente en el polo terminal de la célula glial, donde la conductancia al K^+ es mayor, y es conducido de la retina al humor vítreo y a los capilares del SNC. En especies con retinas vascularizadas, la conductancia es mayor en la porción de la célula que corresponde a la capa nuclear interna, en esta misma región, los capilares rodean a las prolongaciones de las células de Müller, por lo que se propone que en esta zona las células de Müller liberan el K^+ hacia los vasos sanguíneos. En especies con retinas avasculares, la mayor conductancia se presenta en el polo terminal de las células de Müller, por lo que el exceso de K^+ lo liberan al humor vítreo (Newman, 1987).

Las células de Müller poseen en su citoplasma a la enzima anhidrasa carbónica, por lo que ayudan a eliminar el CO_2 de la retina al convertirlo a HCO_3^- . (Mussen y Rosen, 1973). También se ha detectado la enzima glutamina sintetasa en células de Müller de rata adulta (Riepe y Norenberg, 1978), por lo que estas células son capaces de convertir el Glu capturado en glutamina.

Otra característica importante de las células de Müller es que al igual

que otros tipos de células gliales, también poseen canales iónicos sensibles a voltaje; con estudios de fijación de voltaje en células de Müller aisladas enzimáticamente, se han identificado cuatro tipos de canales iónicos dependientes de voltaje: canales de Ca^{2+} sensible al verapamil, canales de K^{+} activados por Ca^{2+} , canal de K^{+} I_A y un canal de K^{+} de corriente entrante rectificante; parece ser que éste último es el único que se activa en condiciones fisiológicas normales y puede ser el que esté involucrado en regular los niveles extracelulares de K^{+} en la retina (Newman, 1985).

5. CLASIFICACION DE LOS RECEPTORES A AMINOACIDOS EXCITADORES.

El Glu es el neurotransmisor excitador más abundante en el SNC de los vertebrados (Cotman et al., 1987). Se ha reportado que juega un papel importante en el desarrollo neural (Hestrin, 1992), en la plasticidad sináptica (Collingridge y Singer, 1990), aprendizaje y memoria (Bliss y Collingridge, 1993) y 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.

Estudios farmacológicos y moleculares han demostrado que los receptores a Glu pueden clasificarse en dos grandes grupos a) receptores ionotrópicos, donde el ligando abre un canal iónico intrínseco, el cual es una proteína heteromérica que puede estar compuesta por subunidades heterogéneas y b) receptores metabotrópicos, los cuales están acoplados a efectores celulares por medio de una proteína que une GTP (proteína G) (Gasic y Hollmann, 1992). En muchas sinapsis del SNC, la liberación de Glu produce una corriente postsináptica excitadora con dos componentes, una corriente rápida y transiente, de la cual son responsables los receptores ionotrópicos no-NMDA, y una corriente lenta que decae después de varios milisegundos inducida por los receptores NMDA; los receptores a Glu metabotrópicos funcionan en aspectos celulares a más largo tiempo por una vía de proteínas G y varios sistemas de segundos mensajeros (Gasic y Hollmann, 1992) (figura 4).

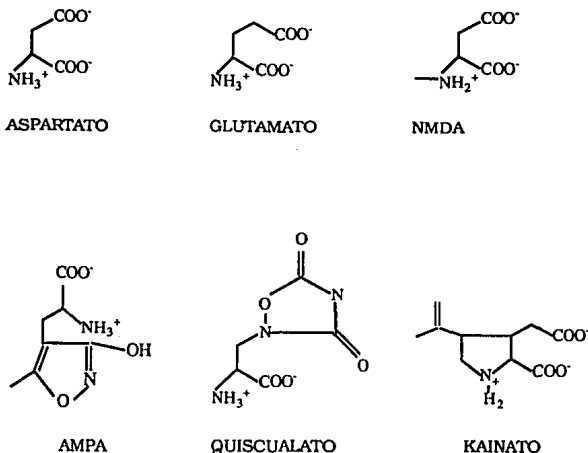


Figura 4. Análogos del ácido glutámico.

a. RECEPTORES IONOTROPICOS

Los receptores ionotrópicos comprenden cuatro tipos definidos por sus agonistas, receptor a NMDA, receptor a AMPA, receptor a KA y receptor a L-AP4 (Cotman e Iversen, 1987). La activación de estos receptores da como resultado la apertura de canales iónicos intrínsecos del receptor, que permiten el paso de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Las cuatro clases de receptores mencionadas han sido caracterizadas por estudios electrofisiológicos, bioquímicos y moleculares; estos canales tienen diferentes propiedades con respecto a su apertura, permeabilidad iónica, conductancia y farmacología (Cotman e Iversen, 1987).

1. RECEPTOR NMDA.

El receptor NMDA presenta una alta permeabilidad a Ca^{2+} y Na^{+} , se sabe que la despolarización inducida por el Glu en estos receptores está asociada con un incremento en la concentración Ca^{2+} intracelular; el canal del receptor NMDA está bloqueado por Mg^{2+} de manera voltaje dependiente, en soluciones libres de Mg^{2+} , agonistas del NMDA abren canales catiónicos con una relación lineal corriente-voltaje y un potencial de inversión cercano a 0 mV, cuando se agrega Mg^{2+} se produce una reducción de la corriente inducida por NMDA, este bloqueo se suprime cuando se despolariza la membrana (Ascher y Nowak, 1987).

El receptor NMDA presenta un sitio alostérico positivo para la Gly; bajas concentraciones de Gly son suficientes para potenciar la respuesta a NMDA, además parece ser obligatoria su presencia para la apertura del canal, lo cual indica que es un coactivador del receptor NMDA (Ascher y Nowak, 1987). El canal del receptor NMDA puede ser bloqueado no competitivamente por Zn^{2+} y a diferencia del Mg^{2+} , no es dependiente del voltaje, la acción del Zn^{2+} es antagonizar alostéricamente la respuesta a NMDA. Las pollaminas también regulan el canal iónico del receptor NMDA, incrementando la unión de los bloqueadores del canal iónico y al sitio de Gly (Lodge y Johnson, 1990).

El receptor NMDA se activa por los neurotransmisores endógenos L-Glu y L-Asp, no se activa por AMPA ni KA (Watkins et al., 1990). La acción del Glu en los receptores NMDA puede ser selectivamente antagonizada de manera competitiva por el ácido 3- ((±)-2-carboxipiperazin-4-il)-propil-1-fosfónico (CPP) y por el D-(-)-2-amino-5-fosfonovalerato (APV) o no competitivamente con el 7-clorokínurenato (7-Cl-kyn) que actúa en el sitio de unión a la Gly, o en el sitio donde se abre el canal con el (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo (a,d) ciclohepteno-5,10-iminomaleato (MK-801), que es el antagonista más potente del receptor NMDA que se ha reportado (Watkins y Olverman, 1987).

Los receptores NMDA se han encontrado por medio de autorradiografía prácticamente en todo el SNC, predominantemente en el telencéfalo, en el área CA3 del hipocampo y en menor proporción en el giro dentado (Cotman et al.,

1987), esta distribución sugiere que pueden jugar un papel importante en la conducta, el aprendizaje y la memoria, ya que en estas regiones se ha caracterizado que se llevan a cabo dichas funciones (Bliss y Collingridge, 1993).

2. RECEPTOR AMPA

Originalmente el receptor AMPA fue llamado receptor a Quis, sin embargo se ha demostrado que el Quis no es un ligando selectivo ya que presenta alta afinidad por los receptores a KA y metabotrópicos (Young y Fagg, 1990). Agonistas específicos del receptor AMPA son los análogos del ácido iboténico, como el ácido 3-hidroxi-4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo [5,4-c]-piridina-5-carboxílico (5-HPCA); no se han reportado antagonistas específicos para este receptor, sin embargo, las quinoxalinas L-6-clano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) y la 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX) muestran una selectiva y relativamente alta afinidad para unirse a sitios AMPA y bloquear la excitación inducida por AMPA y Quis (Watkins et al., 1990).

Los receptores a AMPA se han localizado en el SNC de una manera paralela a la distribución de los receptores NMDA (Cotman et al., 1987); en rata se han encontrado principalmente en regiones del telencéfalo, con altos niveles en el hipocampo, en las capas I, II y III de la corteza cerebral, en el estriado y cerebelo (Young y Fagg, 1990). Los receptores a AMPA están involucrados en el componente rápido de los potenciales postsinápticos excitadores (Gasic y Hollmann, 1992); son selectivos para cationes monovalentes y se pueden diferenciar de los receptores a KA en que los receptores a AMPA se desensibilizan rápidamente, a diferencia de los de KA que su desensibilización es extremadamente lenta (Barnard y Henley, 1990).

3. RECEPTOR KAINATO

Es difícil discernir entre los receptores de AMPA de los receptores de KA a pesar de que se han identificado sitios de unión selectivos usando KA marcado radioactivamente; sin embargo, varios investigadores sugieren que el efecto neurofisiológico del KA puede ser mediado por el receptor AMPA; existe

evidencia a favor, por ejemplo, $[^3\text{H}]\text{KA}$ se une a sitios de alta y baja afinidad en membranas de cerebro de rata, con una K_d en el rango de nanomolar, sin embargo, se requieren concentraciones micromolares para inducir una respuesta excitadora y a estas concentraciones el KA también interactúa con el sitio de unión a $[^3\text{H}]\text{AMPA}$ (Young y Fagg, 1990). Asimismo, los antagonistas CNQX y DNQX que inhiben al receptor de KA, son inhibidores más potentes del receptor AMPA (Watkins et al., 1990).

Se han identificado sitios de unión a KA de alta afinidad, los cuales son insensibles a Quis y AMPA (Barnard y Henley, 1990). En rata presentan una distribución complementaria a los sitios NMDA, predominantemente en el telencéfalo, en lugares donde la densidad de sitios NMDA es muy baja, en el hipocampo, en la región final de la fibra musgosa, en el estrato lúcido, en la corteza cerebral en las capas V y VI, en el hipotálamo y en el núcleo reticular del tálamo. También existen sitios de unión a KA que pueden superponerse con sitios NMDA; en el giro dentado de la formación hipocámpal, por ejemplo, KA y NMDA se localizan en la capa molecular interna, mientras que en el cerebelo, ambos receptores están en la capa granular más que en la capa molecular, por otra parte, los sitios de unión a AMPA se encuentran en mayor número en la capa molecular (Cotman et al., 1987).

4. RECEPTOR L-AP4

El receptor L-AP4 fue descubierto porque el L-AP4, es un potente antagonista de una subpoblación de respuestas excitadoras sinápticas en la retina (Slaughter y Miller, 1981); parece ser que el L-AP4 mimetiza la acción del transmisor endógeno en células bipolares ON, y no bloquea la respuesta excitadora producida por NMDA, Quis o KA en la vía OFF (Young y Fagg, 1990). Se sugiere que el receptor L-AP4 en esas células actúa vía proteína G incrementando la hidrólisis de GMPc, lo cual permite la activación de canales que dan una corriente entrante (Gasic y Hollman, 1992).

Un sitio de unión específico de L-AP4 en membranas de las células bipolares no ha sido identificado, sin embargo, un sitio de unión a Glu

dependiente de Cl^- parece ser el receptor L-AP4 (Young y Fagg, 1990) y están localizados presinápticamente; aunque no se han identificado agonistas y antagonistas específicos para este tipo de receptor, sus agonistas son el L-AP4, el L-Glu y la L-D-fosfoferina y su efecto no es antagonizado totalmente por CNQX (Watkins et al., 1990).

b. RECEPTORES METABOTROPICOS

Los receptores metabotrópicos están acoplados a una proteína G y generan cascadas de segundos mensajeros, en algunos casos estimulan la hidrólisis de fosfatidil inositol, para la formación de IP_3 y DG (Berridge, 1984) o bien activan o inhiben a la adenilato ciclasa, enzima responsable de la formación de AMPc (Pieroni et al., 1993).

Los receptores metabotrópicos a Glu forman una familia con una secuencia altamente conservada; todos ellos poseen siete segmentos transmembranales con el extremo N-terminal extracelular (Tanabe et al., 1992). Pueden ser estudiados e identificados por medio de un agonista selectivo de receptores acoplados a la hidrólisis de fosfatidil inositol, el ácido trans-1-amino-ciclopentil-1,3-dicarboxílico (tACPD) (Palmer, 1989), y de manera no tan selectiva por el Quis y el L-Glu pero no por AMPA (Schoepp et al., 1990); el efecto inducido puede ser antagonizado por el L-AP4, el L-2-amino-3-fosfonopropionato (AP3); el ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico (AP5), por otra parte, se ha reportado que su estimulación puede inhibir el efecto de la activación por el NMDA (Schoepp et al., 1990).

6. BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES A AMINOACIDOS EXCITADORES

a. BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES IONOTROPICOS

1. RECEPTORES NMDA

La primera secuencia que codifica para una subunidad que constituye al receptor NMDA, NMDA-R1, fue clonada a partir de una biblioteca de DNAC de cerebro anterior de rata y caracterizada en ovocitos de *Xenopus* (Moriyoshi et

al., 1991); otras cuatro secuencias que codifican para cuatro subunidades de este receptor (NMDA-R2A, B, C, D) fueron clonadas con base en su homología con NMDA-R1 y haciendo oligos por medio de la técnica de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Monyer et al., 1992, Wisden y Seeburg, 1993). La expresión de NMDA-R1 en ovocitos de *Xenopus* demostró que este canal homo-oligomérico presenta muchas de las propiedades del receptor nativo NMDA (Nakanishi et al., 1992). Sin embargo, existe evidencia que el receptor a NMDA nativo es un canal heteromérico, esto se ha dilucidado mediante la coexpresión de la subunidad NMDA-R1 con miembros de la familia de la subunidad NMDA-R2 (Monyer et al., 1992); se ha visto que la eficiencia de ensamblaje de las subunidades dentro de los canales heteroméricos funcionales es mayor, la corriente que se expresa es cien veces mayor que en los ovocitos donde sólo se expresaron receptores homo-oligoméricos NMDA-R1 y las propiedades de modulación del heterómero está particularmente en la subunidad NMDA-R2, donde se incluye el fuerte bloqueo por Mg^{2+} , sensibilidad a Gly y la cinética de apertura del canal (Wisden y Seeburg, 1993). La permeabilidad del canal del receptor NMDA se encuentra en el residuo de asparagina del segmento transmembranal 2 (TM2) de NMDA-R1 y de NMDA-R2 (Burnashev et al., 1992); En la subunidad NMDA-R1 la sustitución del residuo de asparagina por una glutamina decrece la permeabilidad a Ca^{2+} , mientras que la misma sustitución en la subunidad NMDA-R2 reduce fuertemente el bloqueo por Mg^{2+} (Sakurada et al., 1993).

La estructura propuesta para el receptor NMDA con base a todos los estudios moleculares que se han hecho, y por analogía con otros canales iónicos sensibles a ligando, se propone que este receptor posea un dominio N-terminal extracelular donde se une el ligando, seguido de cuatro dominios transmembranales y un dominio C-terminal extracelular; el dominio transmembranal TM2 formaría el poro del canal del receptor, donde el residuo de asparagina presente en TM2 es importante para la selectividad iónica (Nakanishi et al., 1992), presenta un dominio intracelular que contienen la secuencia consenso común para una proteína cinasa dependiente de

Ca²⁺/calmodulina (PKCa²⁺/CaM), así como de una proteína cinasa C (PKC), el dominio N-terminal extracelular contiene 10 sitios posibles de glicosilación (Karp et al., 1993).

Se propone que el receptor NMDA funcional consiste de la subunidad NMDA-R1 y de al menos una subunidad NMDA-R2; la subunidad NMDA-R1 se ha encontrado prácticamente en todas las neuronas, mientras que la subunidad NMDA-R2 se expresa de manera específica en diferentes partes del SNC (Monyer et al., 1992); y es la que da las propiedades específicas para cada subtipo de canal del receptor NMDA. Se han encontrado al menos siete formas (NMDA-R1A-NMDA-R1G) de la subunidad NMDA-R1 expresadas por edición alternativa de manera específica; todas estas isoformas fueron capaces de inducir una corriente entrante en respuesta a la aplicación de 100 μ M de NMDA en un medio libre de Mg²⁺ y con 10 μ M de Gly (Durand et al., 1992, Sugihara et al., 1992); las diferencias de las secuencias se encuentran principalmente en el dominio extracelular amino terminal y en la porción hidrofóbica del amino terminal, lo que le podría dar las diferentes sensibilidades a agonistas y antagonistas, así las diferencias en las propiedades alostéricas del receptor (Wisden y Seeburg, 1993). Recientemente, el grupo de Nakanishi (1993) ha clonado la secuencia que codifica para la subunidad NMDA-R1 del receptor NMDA de humano, la cual presenta una homología mayor de un 90% con respecto a la subunidad NMDA-R1 de rata, y sus características electrofisiológicas y bioquímicas al expresarlo en ovocitos de *Xenopus* son muy similares a las descritas para el receptor NMDA-R1 de rata; el gene que codifica para el receptor NMDA-R1 de humano ha sido localizado en el cromosoma 9 en su región q34.3 (Karp et al., 1993).

2. RECEPTORES NO-NMDA

Desde que Hollmann y colaboradores (1989) clonaron la primera secuencia que codifica para una subunidad del receptor AMPA/KA (Hollmann et al., 1989), una familia de subunidades relacionadas que forman un complejo canal-receptor AMPA/KA han sido identificadas por hibridación cruzada y por

técnicas de amplificación del DNA como la PCR (Nakanishi, 1992). Es un poco difícil lograr separar a los receptores a AMPA de los receptores a KA, ya que muchas veces los dos agonistas son capaces de inducir una respuesta en un mismo receptor. Sin embargo, se han categorizado como receptores diferentes ya que existen sitios de unión de alta afinidad para KA y para AMPA, con una distribución anatómica diferente (Gasic y Hollman, 1992).

Las subunidades de los receptores no-NMDA pueden ser subclasificados en tres grupos: el primero consiste de 4 subunidades (GluR1-4), que muestran una alta afinidad por AMPA, mientras que los otros dos grupos son dos diferentes formas de subunidades selectivas para KA (GluR5-7 y KA-1 y KA-2) (Nakanishi, 1992).

1. Receptor AMPA

En 1989, el grupo de Heinemann clonó, por primera vez, una secuencia que codifica para un subtipo de receptor a Glu de una biblioteca de DNAC de cerebro anterior de rata; al expresarlo en ovocitos de *Xenopus*, se encontró un receptor funcional con las propiedades farmacológicas del subtipo AMPA/KA, que no se desensibiliza en presencia de su agonista por tiempos prolongados (Holleman, 1989). Analizando la secuencia del DNAC se puede predecir una estructura similar a otros receptores ionotrópicos sensibles a ligando, con el dominio N-terminal extracelular con 6 posibles sitios de glicosilación, cuatro dominios transmembranales, donde el TM2 formaría el canal iónico del receptor, en la región intracelular que se localiza entre los segmentos TM3 y TM4 pose varias secuencias consenso de regulación por fosforilación (Nakanishi, 1992) y el extremo C-terminal extracelular; este receptor se localizó en rata de manera abundante en corteza cerebral, cerebelo e hipocampo (Holleman, 1989).

Se han clonado otras tres secuencias que codifican para otras subunidades del receptor ionotrópico de alta afinidad a AMPA por tres grupos independientes: GluR1-4 para el grupo de Heinemann, GluR-D para Seeburg y GluRK1- GluRK4 para Nakanishi (Boulter et al., 1990, Keinänen, 1990 y

Nakanishi et al., 1990). Todas ellas han sido aisladas de DNAC de cerebro de rata y al expresarlas en ovocitos de *Xenopus* son receptores homoméricos funcionales, que se activan por AMPA, Quis y en menor proporción por KA, pero no se activan con NMDA, lo que indica que es un receptor tipo no NMDA (Wisden y Seeburg, 1993).

Las subunidades GluR1-4 presentan una estructura muy similar entre ellas y con otras subunidades clonadas de receptores ionotrópicos sensibles a ligando (Nakanishi, 1992), tienen un peso molecular aproximado de 98 Kd y están constituidas de aproximadamente 860 a 880 aminoácidos (Gasic y Hollmann, 1992).

La coexpresión de pares heterogéneos de subunidades del receptor ionotrópico tipo AMPA, da como resultado un receptor con propiedades en la conductancia que difiere de aquellas cuando son expresadas de manera independiente, y que se parece mucho más a las propiedades electrofisiológicas expresadas en el receptor nativo, lo que sugiere que el receptor AMPA sea heteromérico (Nakanishi et al., 1990). Cuando se expresan las subunidades GluR1 con GluR3 en ovocitos de *Xenopus* en una solución Ringer normal, se presenta una corriente entrante rectificante, que no se presenta cuando se expresa GluR2 con cualquiera de ellas, lo que sugiere que la subunidad GluR2 domina las propiedades de flujo iónico del receptor (Nakanishi et al., 1990, Wisden y Seeburg, 1993). En una solución Ringer normal todas las GluR presentan una corriente entrante de Na^+ y una corriente saliente cuando existe un potencial de membrana positivo, lo que indica que se trata de un flujo de K^+ ; en una solución libre de Na^+ y K^+ , pero adicionada con Ca^{2+} , GluR1, GluR3 y GluR1+R3 presentan una corriente entrante significativa, cuando es inducida por AMPA, Quis, KA y domoato, mientras que, GluR2+R1 o R3 esta corriente fue eliminada, lo que sugiere que GluR1 y GluR3 son permeables a Ca^{2+} (Hollman et al., 1991). Esto se apoya en el hecho de que, en glia de Bergmann se ha descrito un flujo de Ca^{2+} al ser estimulado por AMPA y mediante hibridación in situ se identificaron las subunidades GluR1 y GluR4 pero no GluR2 (Wisden y Seeburg, 1993). Así mismo, en glia de Bergmann y en glia de

Müller, por medio de de hibridización con oligos específicos de GluR1-4 se identificaron las subunidades GluR1, GluR3 y GluR4 pero no se detectó señal de GluR2 (López et al., 1994).

Se sugiere que en el segmento transmembranal TM2 se encuentra la selectividad iónica del canal del receptor. Se ha identificado un sitio llamado Q/R responsable de esta actividad, y corresponde a una glutamina en las subunidades GluR1, R3 y R4 en las posiciones 582, 590 y 587 respectivamente, y una arginina en el sitio equivalente 586, en la subunidad GluR2 (Verdoorn et al., 1991). Por medio de mutagénesis dirigida, en la subunidad GluR2 se cambió la arginina por una glutamina, y se observó que en respuesta a KA presentó una corriente entrante de Ca^{2+} , lo que dio pauta para proponer que la permeabilidad al Ca^{2+} está dada por un aminoácido en una posición sumamente conservada (Hume, 1991). Cuando se analizó el DNA genómico que codifica para el segmento TM2 de la subunidad GluR2, no se encontró el codón para la arginina, sino que estaba presente el de la glutamina; sin embargo, con excepción del cambio de una arginina por glutamina, la secuencia del exón es igual al DNAC de GluR2, lo que sugiere que el cambio de glutamina por arginina se genera post-transcripcionalmente por edición del RNA (Sommer et al., 1991)

Adicionalmente a la familia de receptores de alta afinidad a AMPA, GluR1-4, cada uno de los receptores existe en dos formas moleculares que difieren en su secuencia por la inserción de un segmento que precede a la región transmembranal cercana al carboxilo terminal, lo que les da las dos versiones llamadas flip y flop, ese segmento de 115 pares de bases (pb) se da a través del uso alternativo de dos secuencias exónicas presentes en el transcrito primario de los genes de esta familia (Sommer et al., 1990). Las formas flip y flop difieren un poco en su respuesta a L-Glu y a AMPA en relación al KA, con respecto a la corriente inducida por el ligando y no por la unión del ligando al receptor; mientras que en células que expresan la versión flip, a soluciones saturadas de KA y L-Glu provocan corrientes con amplitudes similares, en las versiones flop, el KA provoca corrientes mucho mayores que aquellas producidas

por L-Glu; estas observaciones confirman que tanto AMPA como KA actúan sobre un receptor común, y que dependiendo del tipo de subunidades que conforman el receptor, éste tendrá una afinidad y una conductancia diferente (Sommer et al., 1990).

La expresión de las diferentes subunidades dentro del SNC difieren un poco, no sólo anatómicamente sino que también durante el desarrollo (Monyer et al., 1991). Los RNA mensajeros (RNAs) de las subunidades GluR1-4 han sido detectados en el cerebro de embrión de rata, siendo la más abundante GluR2; en estado posnatal es mucho más abundante el RNAm de la versión flip en corteza e hipocampo (giro dentado, CA1 y CA3), mientras que los RNAs de las versiones flop se detectan en etapas posteriores a la etapa posnatal en el cerebelo; ambas versiones están presentes durante todo el desarrollo e incrementan gradualmente durante la maduración del organismo (Monyer et al., 1991). En rata, GluR2 se encuentra uniformemente en todas las capas de la corteza, mientras que GluR1 y GluR3 en las capas II y IV, en la capa de las células piramidales del giro dentado y GluR4 se localiza en corteza entorrinal, en CA1 y giro dentado, todas las subunidades están presentes en la formación hipocámpal (Keinänen et al., 1990).

Los genes que codifican para las subunidades del receptor ionotrópico AMPA de humano, GluR1-4, han sido localizados en los cromosomas 5q32-33, 4q32-33, Xq25-26 y 11q22-23 respectivamente (McNamara et al., 1992).

El grupo de Mishina ha clonado de una biblioteca de DNAc de cerebro anterior de ratón, secuencias que codifican para toda una familia de subunidades de los receptores ionotrópicos del tipo no- NMDA, todas ellas con una estructura similar a otras subunidades de este tipo de receptor. Las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ corresponden a las subunidades GluR1 y GluR2 respectivamente, $\beta 2$ a GluR6, y $\gamma 2$ y $\delta 1$ forman un cada una un grupo diferente ya que su homología con otras subunidades descritas es muy baja (Yamazaki et al., 1992).

II.Receptor a kainato

La primera proteína que une KA (KBP) con baja afinidad fue aislada de cerebelo de pollo, y es insensible a Quis y NMDA (Gregor et al., 1988); por medio de anticuerpos monoclonales sólo se localizó en la membrana de la glia de Bergmann (Somogyi et al., 1990). La estructura de la KBP propuesta con base a su DNAc, es que es un solo polipéptido, de un peso de 49 Kd con 4 dominios transmembranales, presenta sitios posibles de fosforilación en el dominio intramembranal (Gregor et al., 1989), de hecho la KBP *in vitro* es fosforilada por una proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) (Ortega y Teichberg, 1990); por las características antes mencionadas existe la posibilidad de que esta proteína pueda formar parte de un canal iónico y puede ser una subunidad de un receptor a Glu tipo KA (Gregor et al., 1989). Sin embargo, cuando se expresen ovocitos de *Xenopus* no se encontró respuesta fisiológica.

Por otra parte Hampson y Wenthold (1988), purificaron una KBP de cerebro de rana de un peso molecular 48 Kd, con una estructura similar a la KBP en cerebelo de pollo, y al igual que esta última, cuando se expresa en células COS-7, no forma un canal funcional (Wada et al., 1989).

La subunidad del receptor a Glu de tipo ionotrópico KA-1, se aisló de una biblioteca de DNAc de cerebro de rata. KA-1 tiene un peso molecular de 105.2 Kd y es un polipéptido de 936 aminoácidos (Werner et al., 1991); tiene una secuencia de aminoácidos similar en un 53% a las subunidades GluR1-4, y de un 37% de similitud con KBP de pollo y la KBP de rana, sobre todo en la mitad de la secuencia hacia el extremo C-terminal. Por su baja homología con los grupos antes mencionados se les asignó un grupo aparte. El análisis del DNAc sugiere que la estructura de la proteína, tiene cuatro dominios transmembranales, con el extremo N-terminal extracelular con secuencias consenso de N-glicosilación. KA-1 no muestra unión a AMPA y la unión a KA es reversible y saturable y aunque también responde en menor medida a Quis y a Glu, se le ha designado como un receptor de alta afinidad a KA. Por medio de hibridación *in situ* en rata, KA-1 se localizó en la región CA3 del hipocampo, en

las capas II, V y VI de la corteza cerebral y en las células de Purkinje del cerebelo (Werner et al., 1991).

Otra subunidad que une KA con una alta afinidad, fue clonada de cerebro de rata y es la llamada KA-2, cuando se expresó en ovocitos de *Xenopus* el homómero no genera un canal sensible al agonista, pero al coexpresarlo con las subunidades GluR5 o GluR6 fue posible observar una corriente iónica entrante, diferente a la que se observa cuando se expresan las subunidades de manera independiente; cuando se coexpresan KA-2 y GluR6 el AMPA es capaz de inducir una corriente no desensibilizante (Herb et al., 1992). KA-2 es una proteína de 109 Kd, con un 68% de identidad con KA-1 y un 42% de homología con GluR5 o GluR6, tiene una afinidad mayor por KA y en menor proporción por Quis, domoato y Glu, no es sensible a AMPA; en rata se ha localizado en las capas II/III y V/VI de corteza cerebral, en el complejo hipocámpal y en la capa granular del cerebelo (Herb et al., 1992).

El otro grupo de subunidades de los receptores que unen KA con una alta afinidad, lo forman las subunidades GluR5-7, todas ellas fueron aisladas de DNAC de cerebro de rata, y tienen una estructura muy similar, el extremo N-terminal en la región extracelular, con varios sitios consenso de N-glucosilación, seguidos por cuatro segmentos transmembranales (Nakanishi, 1992).

La subunidad GluR5 tiene un 40% de homología con las subunidades AMPA/KA GluR1-4, forma un canal iónico homomérico funcional en ovocitos de *Xenopus* que responde muy débilmente a Glu y que se desensibiliza muy rápidamente en presencia del agonista. El DNAC de GluR5 tiene una secuencia altamente conservada, en la mitad del extremo N-terminal tiene una secuencia altamente hidrofóbica y se propone que se podría expandir en la membrana. Es un polipéptido de 890 aminoácidos y tiene un peso de 100.9 Kd. Se expresa en corteza cerebelar, hipocampo, ganglio de la raíz dorsal y en retina (Bettler et al., 1990). El gen humano que codifica para la subunidad GluR5 ha sido identificado en el cromosoma 21 en la región q21.1-22.1 (Eubanks et al., 1993).

El DNAC de la subunidad GluR6 al ser expresado en ovocitos, presentó

un canal funcional con una alta afinidad por KA, y con propiedades similares a las de GluR5. Es un polipéptido de 884 aminoácidos y de un peso molecular de 96.2 Kd, posee un 40% de homología con las subunidades GluR1-4 y con GluR5 una homología de un 80%. Por medio de hibridación *in situ* en rata, se ha identificado en el lóbulo olfatorio, en la corteza piriforme, en el giro dentado del hipocampo y en la capa de células granulares del cerebelo (Egebjerg et al., 1991). GluR5 y GluR6 tienen dos formas, la diferencia radica en el dominio transmembranal TM2, que por edición de RNA puede presentar una arginina o una glutamina en el sitio Q/R, lo que le da diferentes propiedades en la selectividad iónica del canal. También, se han identificado dos residuos en el dominio transmembranal TM1 de GluR6 que pueden ser alterados por edición de RNA (Gasic y Hollman, 1992).

Por último, el grupo de Heinemann también clonó la secuencia que codifica para la subunidad GluR7; GluR7 tiene un 75% de homología con GluR5 y GluR6, es un polipéptido de 88 aminoácidos y de un peso molecular de 100 Kd. En membranas de células de HeLa transfectadas con el plásmido que expresa a GluR7 se observó que la unión de $[^3\text{H}]$ KA es específica y saturable. Cuando se expresó en ovocitos de *Xenopus*, forma un canal homomérico funcional, con una rápida desensibilización en presencia del agonista y presenta una alta actividad con domoato y KA, en menor proporción a L-Glu y Quis y no presenta actividad con AMPA (Bettler et al., 1992). Se sabe que el aminoácido responsable de la permeabilidad del canal de los receptores GluR2, GluR5 y GluR6 es una arginina en el segmento transmembranal TM2 en el sitio Q/R, generada de manera postranscripcional por edición del RNA (Sommer et al., 1991), mientras que GluR7 presenta una glutamina en ese sitio (Bettler et al., 1992).

b. BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES METABOTROPICOS

Por medio de técnicas de hibridación cruzada y PCR, se han clonado al menos 6 secuencias que codifican para 6 subtipos de receptores metabotrópicos a Glu (mGluR1-6) (Nakanishi, 1992).

Según su secuencia y por el tipo de efector que induce, los receptores metabotrópicos pueden ser divididos en tres grupos:

- Grupo 1: que incluye a mGluR1 α , mGluR1 β y mGluR5. Su activación estimula la formación de IP₃ y son activados por Quis>Glu \geq ibotenate>tACPD, son poco sensibles a la toxina pertusis.
- Grupo 2: mGluR2 y mGluR3, su activación induce un decremento en los niveles intracelulares de AMPc; son activados por Glu=tACPD>ibotenate>Quis.
- Grupo 3: mGluR4 y mGluR6, su activación inhibe la acumulación de AMPc inducida por forskolina, son activados preferencialmente por AP4>Glu>>tACPD. (Nakanishi, 1992, Tanabe et al., 1993).

La primera secuencia clonada que codifica para un receptor metabotrópico (mGluR1 α) se obtuvo de una biblioteca de DNAc de cerebelo de rata y se clonó por medio de un ensayo de expresión en ovocitos de *Xenopus* (Masu et al., 1991). Su activación induce la formación de IP₃ y la movilización de Ca²⁺, es poco sensible a la toxina pertusis, y se activa preferentemente por Quis, Glu, ibotenate y tACPD (Masu, et al., 1991); por medio de hibridización *in situ* en rata se han identificado en células de Purkinje del cerebelo, en el bulbo olfatorio, células granulares del giro dentado, células piramidales de las regiones CA2 y CA4 del hipocampo y en neuronas del tálamo (Shigemoto et al., 1992).

Se ha aislado una forma alternativa de mGluR1, la mGluR1 β , generada como resultado de la inserción de un segmento de DNA que contiene un codón de terminación en la región que sigue del último segmento transmembranal (Pickering et al., 1993).

Los tres receptores mGluR2-mGluR4 fueron aislados de una biblioteca de DNAc de cerebro de rata por medio de hibridización cruzada con el DNAc de mGluR1 (Tanabe et al., 1992). Las secuencias de aminoácidos de los mGluR2-4, están compuestas de 872, 879 y 912 residuos de aminoácidos y las proteínas tienen un peso molecular de 95.77, 98.96 y 101.81 Kd respectivamente; todos

ellos conservan entre sí una homología de un 40% en la secuencia de sus aminoácidos; presentan residuos de cisteína altamente conservados en el dominio N-terminal extracelular, en la región extracelular entre el primero y segundo segmento transmembranal y en el quinto y sexto segmento transmembranal, lo que sugiere que los residuos de cisteína son importantes en la formación estructural de los mGluRs; poseen secuencias consenso de N-glicosilación en el extremo amino terminal y muchos residuos de serina y treonina para posible regulación por fosforilación en el extremo C-terminal intracelular (Tanabe et al., 1992).

La estimulación de los receptores mGluR2, mGluR3 y mGluR4 induce una disminución en los niveles de AMPc intracelulares. En rata mGluR2 se localiza en células de Golgi de cerebelo, células granulares del giro dentado, corteza cerebral y bulbo olfatorio, la distribución del receptor mGluR3 es preferentemente en corteza cerebral, núcleo reticular del tálamo, células granulares del giro dentado y células gliales, y mGluR4 se localiza en células granulares del cerebelo, neuronas del tálamo y bulbo olfatorio (Tanabe, 1993).

El receptor mGluR5 fue aislado por medio de la técnica de PCR usando como iniciadores secuencias conservadas de los receptores metabotrópicos a Glu. mGluR5 presenta una alta homología (87%) con la secuencia de aminoácidos de mGluR1, y esta acoplada a la hidrólisis de fosfatidil inositol, se estimula por $Quis>L-Glu>tACPD$, por hibridación *in situ* se ha localizado en corteza cerebral, núcleo olfatorio anterior y en el estriado, hipocampo y tálamo de rata (Abe et al., 1992). mGluR6 se localiza predominantemente en retina, no existe un agonista selectivo para este receptor y su activación induce una disminución en la concentración de AMPc intracelular (Nakanishi, 1992).

7. EFECTOS A LARGO PLAZO POR LA ACTIVACION DE LOS RECEPTORES A AMINO ACIDOS EXCITADORES.

La activación de los receptores a neurotransmisores no sólo produce cambios a corto plazo en las células del SNC, sino también por medio de la acción de segundos mensajeros, puede dar lugar a eventos a largo plazo que

alteran el fenotipo celular. Poco se sabe al respecto, sin embargo, muchos investigadores se han dedicado a investigar el papel de ciertos proto-oncogenes inducibles que se expresan tempranamente y que sus productos son factores de transcripción necesarios para la activación de otros genes tardíos (Morgan y Curran, 1991).

a. GENES TEMPRANOS Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Muchos de los proto-oncogenes celulares descritos actúan en varios procesos celulares. Los productos de los proto-oncogenes *fos* y *jun* (Fos y Jun respectivamente), son factores de transcripción que pueden ser inducibles por señales extracelulares y que regulan la expresión de genes blancos selectivos, convirtiendo señales de corto plazo en respuestas a largo plazo (Curran, 1988).

El proto-oncogen *c-fos* se describió primero como el oncogen codificado por el virus de osteosarcoma Finkel-Biskis-Jenkins de ratón (FBJ-MSV), posee varios elementos que regulan su expresión, que se localizan hacia arriba de la región 5' del gene y comprende al elemento responsivo a suero (SRE) a -310 que funciona como un elemento activador inducible y une una proteína nuclear de 67 kDa llamada factor responsivo a suero (SRF) (Morgan y Curran, 1991). Otro elemento que regula la expresión de *c-fos* se localiza a -60 y es el elemento responsivo a AMPc (CRE), al cual se le une una proteína que se une al elemento responsivo a AMPc (CREB), la cual se activa por una PKCa²⁺/CaM (Morgan et al., 1991). *c-fos* codifica para una proteína de 62 kD llamada Fos, que funciona como un activador de la expresión de genes (Curran, 1988).

El proto-oncogen *c-jun* fue identificado como el oncogen de virus de sarcoma de ave 17 (ASV-17) y tiene una alta homología (44%) en la región C-terminal con la secuencia de aminoácidos de la proteína activadora transcripcional GCN4 de levadura (Bohmann et al., 1987). Codifica para la proteína Jun de 40 Kd que es capaz de formar homodímeros y unirse al DNA. El gen *c-jun* consiste de un solo exón y tiene varios elementos en la región 5' que regula su expresión: un elemento parecido a la caja TATA, la caja CAAT y un sitio de unión AP-1 entre estos dos elementos, lo que sugiere que *jun* regula

su propia transcripción, en la región 3' contiene varios poli (A) y secuencias ATTTA que indican que su RNAm de *jun* tiene una vida media corta (Vogt y Bos, 1989). Existe toda una familia de *jun*, en la que se incluye *jun B* y *jun D* que tienen una alta homología con *c-jun* en el dominio activador de la transcripción y en el dominio de unión al DNA y pueden formar homodímeros capaces de unirse de manera funcional a la secuencia AP-1 del DNA (Vogt y Bos, 1989).

Fos y Jun funcionan directamente como reguladores de la transcripción al formar la proteína activadora 1 (AP-1) (Morgan y Curran, 1991). La secuencia consenso AP-1 TGACTCA se encuentra simétricamente en el DNA, lo que sugiere que las proteínas que se unen a ella lo hagan en forma de dímeros. Pueden formarse heterodímeros Fos-Jun, o bien heterodímeros con otros miembros de la familia de *jun* (*jun B* y *jun D*), también se pueden formar homodímeros de Jun que son funcionales no así los homodímeros de Fos (Vogt y Bus, 1989). Por otra parte se sabe que Jun es capaz de formar heterodímeros con algunos miembros de la familia de CREB (CRE-BP1), sin embargo, no se ha visto que sean capaces de inducir la transcripción, además de que se unen preferencialmente a la secuencia consenso de CRE (TGAGCTCA) que a la de AP-1 (Benbrook y Jones, 1990). Todas estas proteínas poseen una secuencia altamente conservada que les permite interactuar entre ellas formando el llamado cierre de leucinas (Lamb y McKnight, 1990).

Los cierres de leucina son α -hélices anfipáticas orientadas paralelamente y que contienen 4 ó 5 leucinas en un intervalo de cada siete residuos. La dimerización es mediada por interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de leucinas de los dominios de las dos proteínas (Lamb y McKnight, 1991). Adyacente a la región N-terminal del dominio del cierre, existen regiones básicas altamente conservadas que se propone, sean las que interactúan directamente con el DNA activando genes que posean en su promotor la secuencia consenso AP-1 (Morgan y Curran, 1991).

b. SEGUNDOS MENSAJEROS Y ACTIVACION DE GENES TEMPRANOS MEDIADOS POR LA ACTIVACION DE RECEPTORES A GLUTAMATO

Varios estudios han probado la existencia de vías de segundos mensajeros que incrementan la concentración intracelular de Ca^{2+} y que están involucradas en la activación de los genes tempranos (Morgan y Curran, 1991). Al menos tres sistemas distintos pueden activar a *c-fos*, PKC, PKA y por $PKCa^{2+}/CaM$.

La PKC es una proteína cinasa que fosforila en serina o treonina y su activación depende del segundo mensajero DG compuesto derivado de la hidrólisis de fosfatidil inositol-4,5 bífosfato (PIP_2) (Berridge, 1984) y de Ca^{2+} (Bell, 1984). La PKA es un tetrámero compuesto de dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras y una vez que es activado por AMPc es capaz entonces de fosforilar a sus sustratos en residuos de serina y treonina (Nairn et al., 1985). El AMPc se forma a partir de ATP por medio de la enzima adenilato ciclasa, la cual es activada por una proteína G que transduce la señal que le llega vía un receptor que se localiza en la membrana celular (Pieroni et al., 1993). Existe una gran variedad de proteínas cinasa cuya activación depende de Ca^{2+} y de CaM, la CaM cinasa II, que es una proteína cinasa multifuncional y que es la mejor caracterizada, y otras CaM cinasa Ia, Ib y IV que aunque están menos caracterizadas, también son capaces de fosforilar múltiples sustratos (Nairn et al., 1985, Schulman, 1993).

Se ha descrito que la activación de receptores a Glu induce la transcripción de genes tempranos (Sonnenberg et al., 1989). La activación de receptores a Glu tipo ionotrópicos, NMDA y KA induce un aumento en la transcripción de *c-fos*, poco se sabe de la vía entre la activación del receptor y la expresión de los genes tempranos, sin embargo, lo que se sabe es que al activarse estos receptores existe un aumento en los niveles intracelulares de calcio, ya sea que el ión sea de origen extracelular o liberado de pozas intracelulares (Penner et al, 1993), y por los resultados de estudios bioquímicos se propone que para el caso del receptor NMDA existe una estimulación de la actividad de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) que da como resultado un aumento en los

niveles intracelulares de prostaglandinas (Piomelli, 1993), que incrementan la actividad de la enzima adenilato ciclasa ya que son capaces de afectar la actividad endógena de GTPasa de la proteína G que activa a la adenilato ciclasa permitiendo que incremente su actividad lo que da como resultado un aumento en los niveles de AMPc y por consiguiente también aumenta la actividad de la PKA (Nairn et al., 1985). Por otra parte, la activación de los receptores a KA induce la formación del complejo calcio-CaM que es capaz de activar una forma de adenilato ciclasa (Choi et al., 1993) y llegando a un punto en común con el receptor NMDA en la activación de la PKA que como ya se mencionó, se ha visto que regula la transcripción de *c-fos* (Lerea y McNamara, 1993).

La activación de los receptores a Glu tipo metabotrópicos induce la transcripción de genes tempranos, ya que aumentan la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana para formar IP₃ que libera Ca²⁺ de pozas intracelulares (Hughes y Michell, 1993), este calcio junto con el DG, el otro compuesto derivado de la hidrólisis de PIP₂ (Berridge, 1984), activan a la PKC, cinasa que también regula la expresión de los genes tempranos (Mayer y Miller, 1990, Morgan y Curran, 1991).

III. ANTECEDENTES

1. RECEPTORES A AAE EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS

Existen varias evidencias que apoyan el hecho de que existen receptores a aminoácidos excitadores (AAE) en la retina de los vertebrados (Coleman et al., 1986). Se propone que el Glu y el Asp son los neurotransmisores endógenos en la retina (Steward et al., 1985) ya que las células de la retina presentan inmunorreactividad ante el Glu (Marc et al., 1990).

La activación de receptores L-AP4 en células bipolares ON, bloquea la respuesta a la luz en células horizontales, se propone que cierra de manera directa canales iónicos, ya que la resistencia de la membrana celular de estas células incrementa cuando se adiciona L-AP4 (Slaughter y Miller, 1981).

En retina de anfibios, células bipolares y horizontales presentan una alta sensibilidad a KA y Quis y no por NMDA; cuando se aplicó el ácido *cis*-2,3 piperidina descarboxílico (PDA), un antagonista no específico de los receptores ionotrópicos a glutamato, la respuesta a la aplicación exógena de KA de las células horizontales así como células bipolares de tipo OFF fue suprimida (Miller y Slaughter, 1986). La respuesta de las células bipolares tipo ON se inhibe con la aplicación de CNQX (Hensley et al., 1993). También se ha descrito que las células amacrinas de anfibios se despolarizan cuando se les aplica KA, Quis y NMDA (Miller y Slaughter, 1986) y en células ganglionales ON-OFF, el CNQX es capaz de bloquear la respuesta de estas células ante la luz (Hensley et al., 1993).

En células ganglionales de mamíferos, el KA induce corrientes entrantes que se antagonizan con el ácido kinurénico, mientras que la corriente inducida por el Quis no fue antagonizada por el ácido kinurénico, sin embargo, este antagonista es capaz de bloquear el efecto del NMDA en estas células (Aizenman et al., 1988, Massey y Miller, 1990). Las células horizontales y las bipolares tipo OFF poseen receptores a glutamato tipo KA, mientras que células amacrinas poseen receptores tanto para KA como para Quis y NMDA (Coleman et al., 1986).

En retina de rata por medio de hibridización *in situ*, se ha visto que los 5 genes que codifican para las subunidades de los receptores ionotrópicos tipo no NMDA GluR1-5, se expresan de manera diferencial (Müller et al., 1992). Células ganglionales expresan las subunidades GluR1-4, GluR2 y GluR4 y se localizan en la capa nuclear interna, mientras que las células amacrinas parecen expresar todas las subunidades (Müller et al., 1992). En retina también se ha visto que se expresa de manera abundante el receptor metabotrópico mGluR6 (Nakanishi, 1992).

En la retina de pollo, se ha identificado sitios de unión de Glu (López-Colomé, 1981), uno dependiente de sodio y sensible a la congelación que corresponde a un sitio de captura, y otro que es independiente de sodio, que no es sensible a la congelación que representa a los receptores sinápticos (López-Colomé, 1981). Estos receptores a Glu se han localizado preferencialmente en células amacrinas, ganglionales y células horizontales, aunque en menor proporción en células bipolares (López-Colomé y Somohano, 1984). Los receptores a Glu en membranas de células de retina de pollo se han caracterizado mediante la unión de un ligando marcado radioactivamente; se han descrito receptores para Glu, Asp, KA, NMDA y Quis, su expresión y propiedades farmacológicas varían durante los diferentes estados del desarrollo embrionario (Somohano et al., 1988).

2. RECEPTORES A AAE EN CELULAS DE MULLER DE LA RETINA

En membranas de células de Müller de la retina de pollos, se identificaron tres poblaciones de receptores a Glu, mediante ensayos de unión de [³H] Asp; la dos primeras poblaciones de receptores con una Kb de 40 y 200 nM se presentaron a 1 DIV y cuando los cultivos estaban en confluencia a los 12 DIV, sólo se expresó la población de receptores con una Kb de 200 nM junto con otra población con una Kb de 1300 nM, todos estos receptores presentan una alta sensibilidad a AMPA (López-Colomé y Romo-de-Vivar, 1991).

Se ha propuesto que las células de Müller puedan presentar sistemas de segundos mensajeros similares a los que poseen las neuronas y que se activen

cuando se estimulan receptores a AAE. En cultivos primarios de células de Müller de retina de pollos, cuando se estimulan con análogos de AAE, se induce la acumulación de fosfoinosítidos (López-Colomé et al., 1993), teniendo el siguiente orden en la eficiencia L-Glu>L-Asp>NMDA>Quis=KA, el efecto es dependiente de Ca^{2+} externo y de Ca^{2+} liberado de pozas intracelulares (López-Colomé et al., 1993). Por medio de hibridización con oligonucleótidos específicos para las subunidades GluR1-4 de los receptores a AMPA, tanto en glia de Müller como en glia de Bergmann, se detectaron las subunidades GluR1, 3 y 4, pero no a la subunidad GluR2 (López et al., 1994), lo que sugiere que ambos tipos celulares comparten características por derivar del mismo linaje celular ya que ambas son glia radial (Bartlett et al., 1981).

Por otra parte también en células de Müller se ha descrito que el Glu puede modular la conductancia a K^+ por dos vías, una rápida quizás por medio de una fosforilación del canal de K^+ y otra lenta activando receptores metabotrópicos; cuando se aplicó Quis, 1S-3R ACPD se observó un aumento en los niveles de AMPc, no así cuando se aplicó AMPA y KA, proponiendo que este AMPc active a una PKA que inhiba a los canales de K^+ (Schwartz, 1993).

IV. OBJETIVO

Debido a que las células gliales de Müller se localizan radialmente a todo lo largo de la retina de los vertebrados (Robinson y Dreher, 1990) y entre las células neurales de la retina existen vías glutamérgicas (Steward et al., 1985) es posible que el Glu interactúe con receptores específicos en las células de Müller modulando la actividad de estas células gliales y que a su vez las células de Müller respondan a esta estimulación. Esto se apoya en el hecho de que por medio de estudios bioquímicos y moleculares se han identificado receptores específicos a Glu en cultivos primarios de células de Müller (López-Colomé y Romo-de-Vivar, 1991, López et al., 1994).

Se ha reportado que la activación de receptores a Glu tanto ionotrópicos como metabotrópicos inducen cambios en la actividad celular tanto a corto como a largo plazo mediante la formación de cascadas de segundos mensajeros (López-Colomé et al., 1993, Schwartz, 1993) y la activación de genes tempranos inducibles como *c-fos* (Lerea y McNamara, 1993), esto trae como consecuencia que los productos de estos genes tempranos que forman factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) puedan modular la transcripción de otros genes tardíos que tengan la secuencia consenso para AP-1 en su promotor (Vogt y Bos, 1989).

El objetivo de este trabajo fue el de identificar si la activación de los receptores a Glu en células gliales de Müller es capaz de inducir la formación de factores de transcripción (AP-1) vía específica, al igual que en los sistemas neurales donde se ha descrito (Lerea y McNamara, 1993), y que esto nos permita proponer qué significado puede tener el hecho de que las células de Müller puedan responder a estímulos neurales reflejada en la expresión selectiva de genes en relación a las interacciones sinápticas que existen en el ambiente en que se encuentran las células de Müller en la retina.

V. MATERIALES Y METODOS

1. REACTIVOS

El [γ - 32 P] ATP (3000 Ci/mmol) fue obtenido de New England Nuclear; el AMPA, AP5, CNQX, 7ClKyn, CPP, KA, MK-801, NMDA y Quid fueron comprados de Tocris Neuroamin, los sistemas de detección de proteínas que unen AP-1 o CRE fueron de GIBCO, las mini columnas de Sephadex G-50 se compraron de Boehringer y todos los demás reactivos fueron obtenidos de Sigma.

2. CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS DE GLIA DE MULLER DE RETINA DE POLLO

El método de cultivo primario de células en este trabajo se hizo en base a la técnica descrita por Adler y colaboradores (1982) y modificada por López-Colomé y Romo-de-Vivar (1991).

Se usaron embriones de pollo de 7 días. Se extrajeron las retinas separándolas del epitelio pigmentado y se lavaron dos veces en solución de Hank libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (0.8 g NaCl, 0.04 g KCl, 0.006 g KH_2PO_4 , 0.0125 g Na_2HPO_4 , 2.0 mg rojo de fenol, 0.1 g glucosa en 100 ml de agua). Después de lavadas las retinas se incubaron 20 minutos en tripsina 0.25% en solución de Hank a 37°C. La reacción enzimática se detuvo con L-MEM (1.338 g de medio de Dulbecco Eagle, al cual se le adicionó 0.05 g glucosa, 0.022 g de NaHCO_3 , 0.025% de pentamicina, 0.025% de gentamicina en 100 ml de agua) + 1% de albúmina bovina (BSA). Las células se disociaron mecánicamente usando una pipeta Pasteur y se filtraron a través de una red de nylon de 50 μm , se diluyeron en H-MEM (misma fórmula de L-MEM pero con 0.22 g de NaHCO_3) sin suero. Se sembraron las células en cajas falcon de 75 cm^2 , colocando el mismo volumen de medio H-MEM con 20% de suero fetal bovino, para obtener H-MEM con 10% de suero.

Las células de los cultivos fueron identificadas como glia de Müller ya

que los cultivos fueron inmunopositivos para el anticuerpo policlonal contra la GFAP que se une a los filamentos intermedios de los astrocitos tipo 1 y como las retinas de los pollos no poseen astrocitos por ser retinas avasculares (Rasmussen, 1974), la marca corresponde a la glía de Müller (López-Colomé y Romo-de-Vivar, 1991).

El medio de cultivo (H-MEM 10% suero) se cambió cada tercer día, hasta que los cultivos tuvieron 12 DIV tiempo al cual el cultivo estaba en confluencia.

A los 12 DIV al cultivo primario se le cambió el medio de cultivo por medio H-MEM sin suero 8 horas antes de utilizarlos para el ensayo. En este mismo medio se colocaron al Glu y sus agonistas (AMPA, Quis, NMDA, KA) por dos horas; cuando se usaron antagonistas (CPP, AP-5, CNQX, MK-801 y 7CIKyn) éstos se colocaron 30 minutos antes que los agonistas, cuando se estimularon los cultivos con NMDA se colocó 15 minutos antes Gly a una concentración final de 10 μ M. En los cursos temporales se aplicó el agonista por el tiempo indicado y después el medio de cultivo se cambió por medio nuevo sin suero, y se dejaron los cultivos hasta completar las dos horas; las concentraciones de los agonistas y antagonistas varían en los diferentes ensayos. Una vez que pasó el tiempo de estimulación se procedió a hacer los miniestractos nucleares.

3. MINIEXTRACTOS NUCLEARES

Para realizar la unión de DNA a proteínas nucleares de células de mamífero se utilizó la técnica de Dignam (1983), modificada por Schaffner (Schreiber et al., 1989), la cual permite una rápida preparación de extracto nuclear, con una buena actividad de unión de DNA a partir de un número pequeño de células. La monocapa de células se lavó con una solución tampón de fosfatos salino (PBS) frío, se cosecharon adicionando 5 ml de PBS frío y se obtuvo el paquete celular centrifugando 5 minutos a 2000 rpm en una centrifuga clínica; el sobrenadante se retiró y el botón se resuspendió en 400 μ l de la solución tampón A fría (10 mM HEPES-HCl pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM

EDTA, 1 mM EGTA, PMSF 0.1 mM, DTT 0.1 mM, 0.5 μ l/ml mezcla de inhibidores de proteasas (IP) 4 mg/ml [aprotinina, leupeptina, pepstatina], 1 mM Na_2MoO_4). La suspensión se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se mantuvo en hielo por 15 minutos, después de esto se agregaron 25 μ l de una solución de NP-40 al 10% y se agitó en un vortex violentamente por 10 segundos. La fracción nuclear se obtuvo centrifugando la muestra anterior por 30 segundos a 15,000 rpm en frío, el sobrenadante se retiró con ayuda de una bomba de vacío y al botón de núcleos se le añadió 50 μ l de la solución tampón C fría (20 mM HEPES-HCl pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, PMSF 0.5 mM, 2 μ l DTT 1 mM, 1 μ l/ml mezcla IP 4 mg/ml, 10 mM Na_2MoO_4). La suspensión de núcleos se agitó por 15 minutos a muy baja velocidad en frío y terminado este tiempo el extracto nuclear se obtuvo centrifugando por 5 minutos a aproximadamente 15,000 rpm. El botón se descartó y al extracto nuclear se le determinó la concentración de proteína por la microtécnica de Bradford (1976). Los extractos fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su uso.

4. MARCAJE DE OLIGONUCLEOTIDOS DE DOBLE CADENA

Para el análisis *in vitro* de la interacción DNA-proteína se utilizó DNA con la secuencia consenso de unión para AP-1 TGACTCA o con la secuencia para CRE TGACTCA marcado radioactivamente. La secuencia de los oligonucleótidos de doble cadena (dc) fue la siguiente:



El oligonucleótido fue marcado en los extremos 5' por fosforilación con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP con la enzima T4 polinucleótido cinasa. En un tubo eppendorf nuevo

de 1.5 ml se adicionaron: 1 μ l oligonucleótido de dc equivalente a 5 ng AP-1 o CRE, 5 μ l del tampón 5x de la polinucleótido cinasa; 10 μ l [γ^{32} P]ATP (10 μ Ci/ μ l), 9 μ l agua bidestilada y 1 μ l T4 polinucleótido cinasa (5 unidades). La mezcla de reacción se incubó por 45 minutos a 37°C; al término de este tiempo se diluyó la mezcla agregando 24 μ l de Tris-HCl 50 mM pH 7.5. El oligonucleótido marcado se separó del [γ^{32} P]ATP libre utilizando una mini columna de Sephadex G-50, que previamente fue centrifugada para compactarla (5 minutos 90 rpm en la centrifuga clínica). El eluido se vuelve a pasar por la columna y a una alícuota de 1 μ l se le determinó las cuentas por minuto (cpm) por la técnica de Cerenkov, obteniendo una incorporación de un 30%.

5. ENSAYO DE RETARDO DE ENTRADA AL GEL

En este ensayo el DNA al interactuar con las proteínas nucleares modifica su movilidad en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante, de tal manera que se retarda la entrada del complejo [γ^{32} P]DNA -proteína al gel. Para reducir la unión inespecífica de proteínas el ensayo se realizó en presencia de poli(dIdC). El ensayo fue originalmente desarrollado para el análisis de proteínas reguladoras de genes de procariontes (Fried, 1981). Brevemente, la reacción de unión se lleva a cabo a 4°C y la mezcla de reacción contiene: 10 μ g de proteína del extracto nuclear, 1 μ g/ μ l de poli(dIdC), 4mM de espermidina y 4 mM de MgCl $_2$, el volumen se ajustó con la solución tampón D (20 mM HEPES pH 7.9, 60 mM KCl, glicerol al 20%, 0.25 mM EDTA, 0.125 mM EGTA, 1 mM DTT) considerando un volumen final de 20 μ l incluyendo al DNA marcado radioactivamente. Esta mezcla se incubó 10 minutos. Al término de este tiempo se agregaron de 0.5-1.0 x 10 5 cpm del DNA marcado (aproximadamente 1 ng de DNA marcado) y se continuó la incubación por 10 minutos más. Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida 6% no desnaturalizante previamente corrido 45 minutos a 100 volts. En un carril extremo se agregó el colorante (azul de bromofenol 0.1 % en glicerol 20 %), y posteriormente el gel

se corrió a 100 volts en 50 mM de Tris/50 mM de ácido bórico/1 mM EDTA hasta que el frente del colorante recorrió más del 80% de la longitud del gel. Una vez que terminó la corrida, el gel se fijó en etanol 10%: acético 10% por 15 minutos. El gel se secó y se expuso ante una película X-Omat (Kodak).

Por último, para el análisis de los datos, las autorradiografías se pasaron por un densitómetro (GelScan XL, Pharmacia), para medir la absorbancia de cada uno de ellos y procesar los datos.

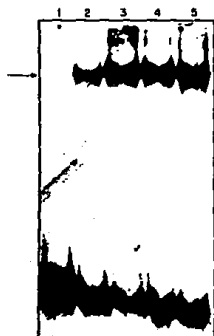
VI. RESULTADOS

Con el objeto de determinar si la activación de los receptores a Glu en células gliales de Müller produce efectos a largo plazo por la activación de proto-oncogenes, se determinó la unión de los factores de transcripción formados con los productos proteicos de estos genes, a sondas de DNA con las secuencias consenso para los factores de transcripción AP-1 y CRE.

Es de hacer notar que previo a los tratamientos se eliminó del medio de cultivo el suero, ya que se ha reportado que existen factores en el suero que inducen la expresión de genes tempranos involucrados en la formación de factores de transcripción (Morgan y Curran, 1991) y que pudieran interferir con nuestros resultados.

Para tener un control positivo de nuestro sistema se estimuló a las células de Müller con acetato de tetradecanoil-forbol (TPA), ya que se sabe que el TPA es un potente inductor de genes de respuesta temprana (Lim et al., 1989). En la figura 5 se observa que, en respuesta al tratamiento con TPA 0.1 μ M, se aumentó la formación del factor AP-1, tal como se esperaba. Asimismo se demuestra que las células de Müller presentan niveles basales del factor de transcripción AP-1 y que la estimulación de Glu y KA, ambos en concentración 1 mM durante 2 horas, incrementa la formación de AP-1.

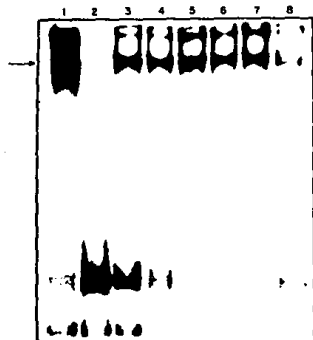
No se observó un efecto sobre la unión al DNA del factor de transcripción CRE en células de Müller como resultado de la estimulación de agonistas del Glu. La figura 6 muestra que concentraciones 1 mM de Glu, NMDA, KA y AMPA no inducen cambios en la formación del factor CRE de manera significativa en células de Müller después de dos horas de estimulación, además de que las células de Müller poseen niveles basales de este factor de transcripción. Como control positivo del sistema se colocaron extractos nucleares de células de Hela, que se conoce expresan de manera constitutiva altos niveles de factores de transcripción (Dignam, 1983) y efectivamente se observa una unión del factor de transcripción a la secuencia consenso CRE en estas células.



CELULAS DE MULLER DE RETINA DE POLLO

- 1-Sonda AP-1
- 2-Control
- 3-Glu 1mM
- 4-KA 1mM
- 5-TPA 0.1 μ M

Figura 5. Retardo de entrada al gel del factor de transcripción AP-1, en células de Müller de retina de pollo, mediada por la activación de receptores a Glu.



CELULAS DE MULLER DE RETINA

- 1-HeLa
- 2-Sonda
- 3-Control
- 4-Glu 1mM
- 5-NMDA 1mM
- 6-KA 1mM
- 7-AMPA + KA 1mM
- 8-Forsk 1 μ M

Figura 6. Retardo de entrada al gel del factor de transcripción CRE en células de Müller de retina de pollo. La señal es producto de la activación de receptores a Glu por los diferentes agonistas.

El efecto del Glu en la inducción de genes tempranos que forman el factor de transcripción AP-1 fue dependiente de la dosis (figura 7) teniendo su máximo efecto a una concentración de 1 mM.

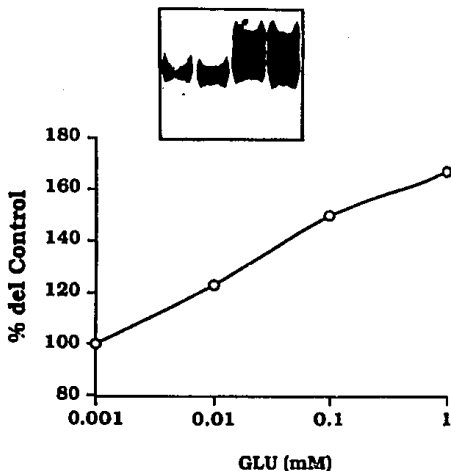


Figura 7. Relación dosis-respuesta del efecto del Glu sobre la inducción de genes tempranos, medida como la unión del factor AP-1 a su secuencia consenso en el DNA, en células de Müller de retina de pollo.

La formación del factor AP-1 mediado por la activación de los receptores a Glu con 1 mM del agonista, fue detectable desde los 15 minutos de estimulación, alcanzando su máxima respuesta a los 60 minutos y manteniéndose constante al menos hasta los 120 minutos tiempo máximo de estimulación que se probó (figura 8).

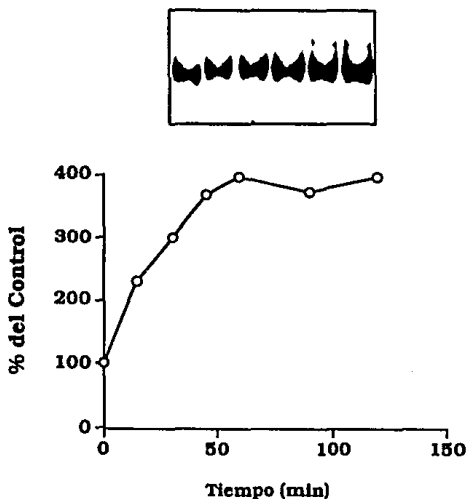


Figura 8. Curso temporal de la formación del factor AP-1 dada por la expresión de genes tempranos inducidos por la activación de receptores a Glu en células de Müller de retina de pollo.

Para poder dilucidar que tipos de receptores a Glu en las células de Müller estaban involucrados en la inducción de genes tempranos, cuyos productos forman el factor de transcripción AP-1, se colocaron diferentes antagonistas específicos que bloquean la respuesta inducida por el Glu. La figura 9 muestra que tanto el CPP como la CNQX a una concentración del μM inhiben la respuesta inducida por el Glu, lo que sugiere que al menos dos clases de receptores a Glu están involucrados en la inducción a largo plazo en este tipo celular, receptores tipo NMDA y receptores tipo AMPA/KA.

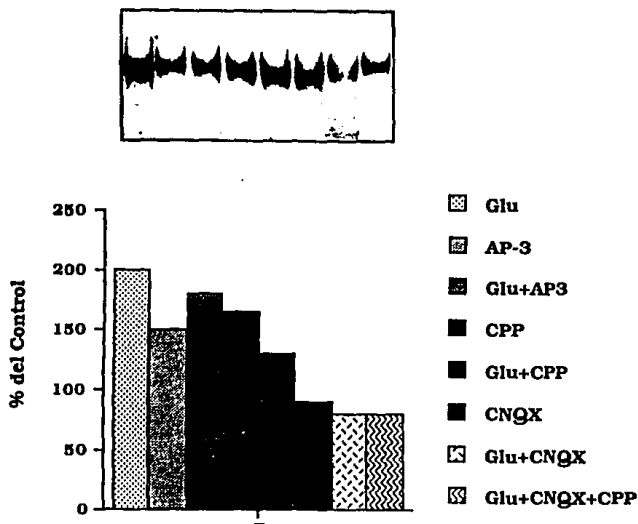


Figura 9. Inhibición de la respuesta inducida por 1 mM de Glu, mediante la acción de antagonistas específicos, CPP, L-AP3, CNQX (0.1 μ M) adicionados 30 minutos antes que el Glu, mediada como la unión del factor de transcripción AP-1 a su secuencia consenso en el DNA, en células de Müller de retina de pollo.

El KA induce respuestas a largo plazo mediante la activación de receptores específicos en células de Müller, ya que induce la transcripción de genes tempranos, que forman factores de transcripción como AP-1, reflejando como un incremento en la unión del factor AP-1 al DNA con la secuencia

consenso para AP-1 de una forma dependiente de la dosis (figura 10), teniendo su máximo efecto con 1mM del agonista.

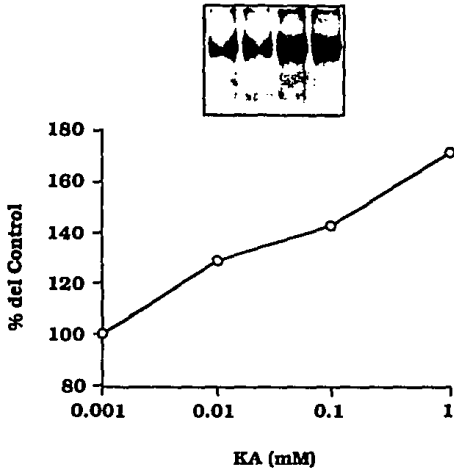


Figura 10. Efecto dependiente de la dosis de la activación de receptores a Glu tipo KA en células gliales de Müller, medido por la unión del factor de transcripción AP-1 a su secuencia consenso.

Al tratar de investigar si el AMPA inducía la formación del factor de transcripción AP-1 en células de Müller, por la activación de receptores a Glu del tipo AMPA, no se detectó efecto alguno después de 2 horas de estimulación con 1 mM de AMPA, sin embargo, como se observa en la figura 11 el efecto sólo se observó al minuto de estimulación, lo cual sugiere que los receptores a AMPA se desensibilizan rápidamente en presencia del agonista por tiempo prolongado.

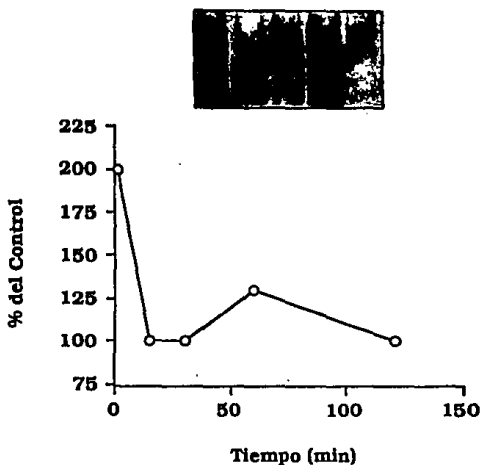


Figura 11. Curso temporal de la inducción de genes tempranos que forman al factor de transcripción AP-1 mediada por la activación de receptores AMPA en células de Müller de retina de pollo.

Muchas veces es difícil distinguir a los receptores AMPA de los de KA debido a que no existen antagonistas específicos para cada uno de ellos y también a que ambos agonistas pueden actuar en los dos tipos de receptores (Watkins et al., 1990). Para poder distinguir el efecto producido sólo por los receptores a KA, se desensibilizaron primero los receptores a AMPA colocando 30 minutos antes de la aplicación del KA, 100 μ M de AMPA. El resultado obtenido se muestra en la figura 12, donde se puede distinguir que la inducción de genes tempranos cuyos productos forman el factor de transcripción AP-1 a las dos horas de estimulación con estos agonistas, fue efecto de la activación

unicamente de los receptores tipo KA, además, dicho efecto fue dependiente de la dosis.

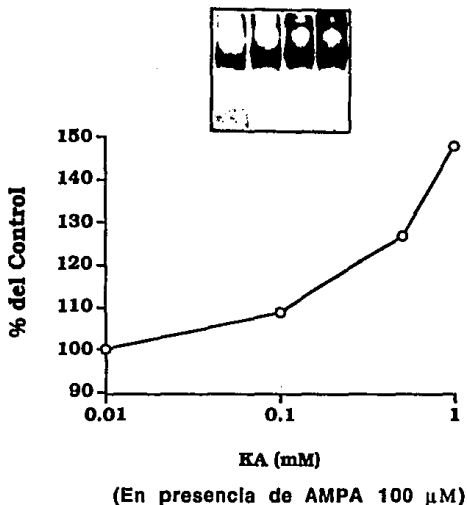


Figura 12. Efecto dependiente de la dosis de la inducción de genes tempranos, medido como la unión de AP-1 a su secuencia consenso mediada por la activación de los receptores a KA.

Para comprobar que el efecto observado en las células de Müller cuando se les estimuló con el AMPA y el KA correspondía a la activación de los receptores específicos AMPA/KA, se colocaron antagonistas específicos de los receptores 30 minutos antes que la aplicación del agonista, para que bloquearan la respuesta inducida por la activación de estos receptores. La tabla 1 muestra que 1 μ M de CNQX antagonista de los receptores AMPA/KA disminuyó en un 50 por ciento el efecto producido por la activación del receptor

a KA, mientras que el CPP (10 μ M) antagonistas de los receptores tipo NMDA no tuvo efecto alguno sobre la inducción mediada por la activación del receptor KA, lo que sugiere que la activación de genes tempranos que codifican para las proteínas que forman al factor de transcripción AP-1 cuando se estimulan con KA, está dado de manera específica por la activación de este tipo de receptor.

TABLA I

		A G O N I S T A				
A N T A G O N I S T A S	NINGUNO	NINGUNO	GLU	NMDA	KA	QA
		100	182	180	132	127
	L-AP3 1 μ M	136	162	N.D.	N.D.	N.D.
	CNQX 0.1 μ M	103	N.D.	56	118	143
	1 μ M	100	75	120	62	N.D.
	CPP 1 μ M	165	128	95	N.D.	N.D.
	10 μ M	107	N.D.	100	134	138
7ClKyn 1 μ M	130	N.D.	107	N.D.	N.D.	

Tabla I. Formación del factor de transcripción AP-1 dado por la activación de genes tempranos, inducidos por la activación de receptores a Glu por sus agonistas (KA, NMDA, Quis y Glu) a una concentración 1 mM y su inhibición por antagonistas específicos. N.D.= no determinado. Los valores representan un experimento típico y se expresan como porcentaje del control.

La figura 9 da pauta para sugerir que existe al menos otro tipo de receptor a Glu cuya activación induce una respuesta a largo plazo en las células de Müller, el receptor tipo NMDA. El efecto del NMDA en las células de Müller de retina de pollo fue dependiente de la dosis (figura 13), induciendo en un 250 % la formación del factor de transcripción AP-1 respecto al control, con 1 mM de NMDA y dos horas de estimulación.

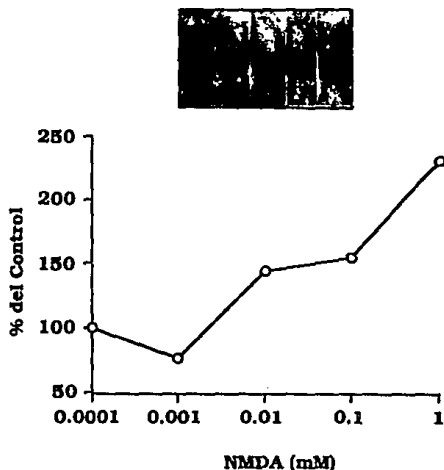


Figura 13. Efecto dependiente de la dosis de la activación de receptores a Glu tipo NMDA en células gliales de Møller, medido como la unión del factor AP-1 a su secuencia consenso.

Además, esta inducción es específica por la activación de este receptor ya que el CPP, antagonista competitivo de los receptores NMDA, a una concentración de $1 \mu\text{M}$ reduce en un 52 % la respuesta inducida por el NMDA, mientras que la CNQX a la misma concentración no tiene un efecto tan pronunciado. El receptor NMDA posee un sitio de regulación alostérico positivo para la Gly; al aplicar Gly $10 \mu\text{M}$ 15 minutos antes de la aplicación del NMDA la respuesta inducida por el NMDA se potenció en un 50 % (los datos no se muestran) por lo que en todos los casos se utilizó NMDA en presencia de Gly. Cuando se colocó el 7 ClKyn antagonista para el sitio de la Gly a una

concentración de 1 μM no se observó que tuviera un efecto en la inducción dada por el NMDA (Tabla 1).

El quisqualato, otro análogo del Glu se une a receptores de tipo AMPA y a receptores metabotrópicos (Young y Fagg, 1990), induce muy poco la activación de genes tempranos para la formación del factor de transcripción AP-1 comparado con la inducción dada por otros analogos del Glu (Figura 14) y no presenta inhibición por CPP ni por CNQX (tabla 1), lo que podría sugerir que se tratara de la activación del receptor tipo metabotrópico y no ionotrópico,

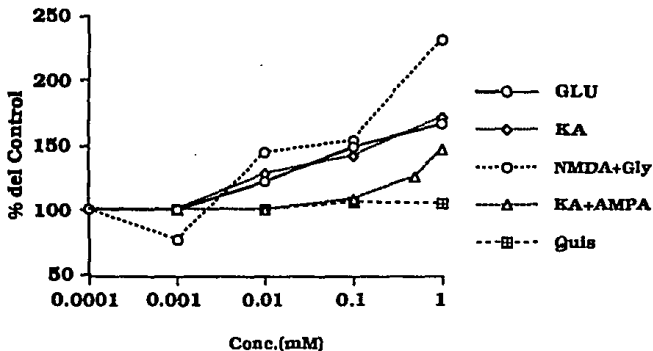


Figura 14. Inducción de genes tempranos, cuyos productos forman el factor de transcripción AP-1 dado por la activación de los diferentes tipos de receptores a Glu en células de Müller de retina de pollo.

De la figura 9 se puede deducir que la activación de receptores tipo metabotrópico no es muy significativa en las células de Müller, ya que el L-AP3 antagonista no competitivo de los receptores metabotrópicos disminuye muy poco el efecto producido por el Glu en estas células (figura 9).

La figura 14 muestra que la máxima inducción de la formación del factor de transcripción AP-1 en células de Müller de retina de pollo con dos horas de

estimulación en presencia de los agonistas esta dada por el Glu, y de manera muy similar por el NMDA, siguiendo en potencia la inducción dada por el KA y en mucho menor proporción el Quis; el AMPA induce una respuesta aproximadamente de un 200% en las células de Müller solo apreciable al minuto de la estimulación (figura 14).

VII. DISCUSION

Las células de Müller forman parte de la glía radial y se encuentran localizadas a todo lo largo de la retina (Robinson y Dreher, 1990), donde se conoce existen vías glutamatérgicas entre los elementos neurales de la retina (Steward et al., 1985), por lo que se propone, que ese mismo Glu sea capaz de activar receptores específicos en las células gliales adyacentes.

Por estudios previos se ha demostrado que las células de Müller poseen receptores a aminoácidos excitadores (López-Colomé y Romo-de-Vivar, 1991, López et al., 1994), y que su activación induce cambios a corto plazo como la formación de fosfoinosítidos, cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} y translocación de la PKC a membranas de células intactas (López-Colomé et al., 1993). Por otra parte, en otros tipos celulares se ha descrito que la activación de receptores a Glu induce cambios a largo plazo, iniciando con la activación de genes tempranos inducibles (Sonnenberg, 1989), como *c-fos* y *c-jun* cuyos productos proteicos forman el factores de transcripción como AP-1 (Morgan y Curran, 1991), que posteriormente regulan la activación de los llamados genes tardíos si poseen en su promotor la secuencia consenso para que se una AP-1 (Lerea y McNamara, 1993).

El objetivo de este trabajo fue investigar si la activación de los receptores a Glu induce cambios a largo plazo en las células gliales de Müller, midiendo la formación de factores de transcripción como AP-1 y CREB que son producto de la activación de genes tempranos, como un paso necesario para la transcripción de genes tardíos, en la perspectiva de la relevancia que pueda tener el hecho de que las células gliales de Müller puedan responder a estímulos dados por neurotransmisores y que de alguna manera modulen la actividad sináptica que *in vivo* se presenta adyacente a las células de Müller.

Resultados obtenidos indican que la estimulación de las células de Müller de retina de pollo *in vitro* por aminoácidos excitadores induce la transcripción de genes tempranos que forman factores de transcripción, medido como la unión del complejo AP-1 o CRE formado a su secuencia consenso al DNA.

Las secuencias consenso para la unión del factor de transcripción CREB se encuentran en la región reguladora de varios genes tempranos incluyendo a *c-fos* (Morgan et al., 1991). Los resultados obtenidos indican que en las células de Müller no hay una formación significativa del factor de transcripción CREB (figura 6) producto de la transcripción de genes tempranos inducidos por la activación de receptores a Glu, por lo que se sugiere que su expresión sea únicamente constitutiva, ya que las células de Müller sin estimulación presentan niveles basales de CREB. A diferencia de los genes tempranos, cuyos productos forman al factor de transcripción AP-1 (figura 5) que si son inducibles por la activación de receptores a Glu específicos en estas células.

La inducción de genes de respuesta temprana en células de Müller fue mediada por la activación de receptores sensibles a L-Glu; el efecto se midió como la unión del factor de transcripción AP-1 a su secuencia consenso. Este efecto fue dependiente de la dosis (fig 7), teniendo el máximo aumento del factor de transcripción AP-1 al estimular a las células de Müller con 1 mM de Glu, esta respuesta se presentó desde los 60 minutos de estimulación y permaneció constante hasta las dos horas (figura 8), tiempo máximo de estimulación que se probó, debido a que se ha reportado que la síntesis de las proteínas de los genes tempranos como *c-fos* después de la expresión de su RNAm tiene una vida media de dos horas (Morgan y Curran, 1991).

Se ha descrito que las células de Müller a los 12 DIV, tiempo al cual los cultivos primarios están confluentes, presentan sitios de unión específicos para NMDA, Quis, KA y en menor proporción a AMPA (López-Colomé y Romo-de-Vivar, 1991). Cuando se activaron estos receptores de las células de Müller con los análogos del Glu, NMDA, KA, AMPA y Quis se observó que la inducción del factor de transcripción AP-1 en todos los casos fue dependiente de la dosis; la respuesta de las células de Müller después de dos horas de estimulación con los diferentes agonistas fue mayor cuando se aplicó NMDA, induciendo una respuesta similar a la que se presentó cuando se estimuló con Glu, en menor proporción fue la respuesta inducida con KA y el Quis prácticamente no induce respuesta (figura 14). El efecto inducido por la estimulación de las células de

Müller con AMPA, sólo fue detectable al minuto de la estimulación y no a las dos horas como en los demás casos (figura 11), lo que sugiere que estos receptores se desensibilizan rápidamente cuando están en presencia del agonista por tiempo prolongado (Jonas y Sakmann, 1992).

Es difícil distinguir a los receptores KA de los de AMPA ya que ambos receptores no tienen antagonistas específicos y también a que ambos agonistas pueden interactuar con los dos tipos de receptores (Watkins et al., 1990). Sin embargo, por los resultados antes mencionados, a las dos horas de estimulación sólo se distingue la respuesta que corresponde a los receptores a KA cuando se estimula con KA, ya que los receptores a AMPA se desensibilizan rápidamente; para poder dilucidar si el KA sólo actúa con un tipo de receptor, se colocó 30 minutos antes de la estimulación con KA, 100 μM de AMPA con el propósito de desensibilizar los receptores a AMPA y sólo ver el efecto del KA (Jonas y Sakmann, 1992), la respuesta que se obtiene es ligeramente menor que a la observada por la aplicación de KA sin AMPA (fig 14), lo que sugiere que la respuesta dada por la aplicación de KA, sólo está dada por la activación de este tipo de receptor. La inducción de la formación del factor de transcripción mediada por la activación del receptor tipo KA disminuyó en un 50 % con CNQX, antagonista de los receptores AMPA/KA, mientras que el CPP antagonistas de los receptores NMDA a una concentración de 10 μM no tiene efecto sobre la respuesta inducida por el KA (Tabla 1), lo que sugiere que la respuesta inducida por el KA es vía un receptor específico.

Por los resultados obtenidos, al menos otro receptor está involucrado en la inducción de genes de respuesta temprana en las células de Müller, el receptor tipo NMDA. El efecto del NMDA en las células de Müller fue dependiente de la dosis (figura 13), siendo el NMDA el que induce una respuesta mayor en relación a los otros análogos del Glu (figura 14). La inducción de genes tempranos mediada por el NMDA fue disminuida en un 52% por CPP y por CNQX de manera no específica, además cuando se aplicó el 7ClKyn, un antagonista que actúa en el sitio alostérico positivo de la Gly, no se observó que tuviera efecto alguno sobre la inducción dada por el NMDA

(tabla 1). En células de glía de Bergmann se describió un receptor NMDA que no es sensible a Gly ni a Mg^{2+} , sin embargo, el receptor NMDA en células de Müller si es sensible a Gly (López-Colomé et al., 1993), cuando se aplicó Gly 10 μM 15 minutos antes de la aplicación del NMDA, la inducción de la formación del factor de transcripción AP-1 fue mayor en un 50% respecto a cuando sólo se estimuló con el NMDA. Por otra parte, se ha descrito que en células de Müller el NMDA induce la acumulación de fosfoinosítidos (López-Colomé et al., 1993), característica que sólo estaba descrita para receptores de tipo metabotrópico (Nakanishi, 1992), lo que permite sugerir que el receptor NMDA en células de Müller posee otras características diferentes a las descritas para el receptor NMDA en neuronas (Ascher y Norak, 1987).

La inducción de genes tempranos que forman el factor de transcripción AP-1 mediada por el Quis (agonista no selectivo de los receptores a Glu) en células de glía de Müller está dado por la activación de receptores de tipo metabotrópico y no por los de tipo AMPA, ya que la CNQX no inhibe la respuesta inducida por el Quis. La inducción de la formación del factor de transcripción AP-1 mediada por el Quis es mucho menor a la inducida por otros análogos del Glu (figura 14), lo que podría sugerir que la activación de los receptores metabotrópicos no es muy significativa en estas células ya que cuando se aplicó L-AP3 un antagonista no competitivo de los receptores metabotrópicos prácticamente no reduce la respuesta inducida por el Glu en células de Müller (figura 9).

El hecho de que células gliales de Müller presenten receptores a AAE funcionales sugiere que esas células pueden participar en la modulación de las sinapsis entre los elementos neurales de la retina, ya que son capaces no sólo de recibir un estímulo dado sino de responder a él. Las células de Müller presentan respuestas a corto y a largo plazo mediados por la activación de genes tempranos que forman factores de transcripción, necesarios para la regulación de la expresión de genes tardíos que son los que al final van a producir las proteínas efectoras de la respuesta.

Los resultados de este trabajo permiten inferir que al menos tres tipos de

receptores están involucrados en la inducción del factor de transcripción AP-1, todos ellos receptores del tipo ionotrópicos KA, NMDA Y AMPA, sobre todo la activación del receptor NMDA es la que tiene un efecto mayor en la inducción de la formación del factor de transcripción AP-1. Ahora lo que quedaría por resolver es definir justamente la vía que existe entre la activación de un receptor en la membrana celular hasta el núcleo donde se da la transcripción de genes tempranos como *c-fos* y *c-jun* que forman el factor de transcripción AP-1, cuáles son los mecanismos de segundos mensajeros involucrados en la transmisión de la señal y qué tipos de proto-oncogenes se están activando, ya que el factor de transcripción AP-1 puede ser formado con los productos proteicos de diferentes miembros de la familia de Jun, incluso, sin la participación de la proteína Fos, ya que el homodimero de Jun es capaz de formar un AP-1 funcional (Vogt y Bus, 1989). En cultivos primarios de células de Müller la activación de receptores a Glu activa cascadas de segundos mensajeros como la de hidrólisis de fosfatidilinositol para la formación de fosfoinosítidos como el IP_3 , elevación en los niveles intracelulares de Ca^{2+} y la traslocación de PKC a la membrana (López-Colomé et al., 1993), la activación de la PKC podría estimular la transcripción de genes tempranos como a *c-fos* en donde tiene un elemento responsivo a suero (SRE) al cual se une un factor fosforilado por PKC (SREB) (Morgan y Curran, 1991).

En conclusión los resultados obtenidos en este trabajo indican que la activación de receptores a Glu en células gliales de Müller de la retina, está ligada a la regulación de la expresión de genes que estarían implicados en la respuesta a largo plazo de estas células y que esto les confiera la capacidad de modular de alguna manera la actividad sináptica de las células neurales de la retina.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abe, T., Sugihara, H. Nawa, H., Shigemoto, R. Mizuno, N. y Nakanishi, S. 1992. Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J. Biol. Chem.* **267**(19): 13861-13368.
2. Adler, R., Magistretti, P. Hyndman, A. y Shoemaker, W. 1982. Purification and cytochemical identification of neuronal and non neuronal cells in chick embryo retina cultures. *Dev. Neurosci.* **5**:27-39.
3. Aizenman, E., Frosch, M. P. y Lipton, S. A. 1988. Responses mediated by excitatory amino acid receptors in solitary retinal ganglion cells from rat. *J. Physiol.* **398**:75-91.
4. Arenander, A. T., de Vellis, J., Herschman, H. R. 1989. Induction of *c-fos* and *TIS* genes in cultured rat astrocytes by neurotransmitters. *J. Neurosci. Res.* **24**:107-114.
5. Ascher, P. y Nowak, L. 1987. Electrophysiological studies of NMDA receptors. *TINS* **10**(7):248-288.
6. Barnard, E. A. y Henley, J. M. 1990. The non-NMDA receptors: types, protein structure and molecular biology. *TIPS.* **11**:500-507.
7. Bartlett, P. P., Noble, M. D., Pruss, R. M., Raff, M. C., Rattray, S. y Williams, C. A. 1981. Rat neuronal antigen-2 (Ran-2): A cell surface antigen on astrocytes, ependymal cells, Muller cells, and leptomeninges defined by a monoclonal antibody. *Brain Res.* **204**:339-351.
8. Barres, B. A. 1991. New roles for glia. *J. Neurosci.* **11**(12):3685-3694.
9. Barres, B. A., Chun, L. L. Y. y Corey, D. P. 1990. Ion channels in vertebrate glia. *Ann. Rev. Neurosci.* **13**:441-474.
10. Barres, B. A., Koroshetz, W. J., Chun, L. L. Y. y Corey, D. P. 1990. Ion channel expression by white matter glia: The type-1 astrocyte. *Neuron.* **5**:527-544.
11. Bartlett, P. P., Noble, M. D., Pruss, R. M., Raff, M.C., Rattray, S. y Williams, C. A. 1981. Rat neuronal antigen-2 (Ran-2): A cell surface antigen on astrocytes, ependymal cells, Muller cells, and leptomeninges defined by a monoclonal antibody. *Brain Res.* **204**:339-351.

12. Baughman, R. M. y Bader, C. R. 1977. Biochemical characterization and cellular localization of the cholinergic system in the chicken retina. *Brain Res* **138**:469-485.
13. Bell, R. M. 1986. Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* **45**:631-632.
14. Benbrook, D. M. y Jones, N. C. 1990. Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* **5**:295-302.
15. Berridge, M. 1984. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *J. Biochem.* **220**:345-360.
16. Bettler, B., Boulter, J., Hermans-Borgmeyer, I., O'Shea-Greenfield, A., Deneris, E. S., Moll, C., Borgmeyer, U., Hollmann, M. y Heinemann, S. 1990. Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron*. **5**:583-595.
17. Bettler, B., Egebjerg, J. Sharma, G., Pecht, G., Hermans-Borgmeyer, I., Moll, C., Stevens, C. F. Heinemann, S. 1992. Cloning of a putative glutamate receptor: a low affinity kainate-binding subunit. *Neuron*. **8**: 257-265.
18. Bevan, S. 1990. Ion channels and neurotransmitter receptors in glia. *Seminars in The Neurosciences*. **2**:467-481.
19. Bignami, A. 1984. Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. *Brain Res*. **300**:175-178.
20. Bliss, T. V. P. y Collingridge, G. L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. **361**:31- 39.
21. Bohmann, D., Bos, T.J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. y Tjian, R. 1987. Human proto-oncogen *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*. **238**:1386-1392.
22. Bonilla, B. 1985. Organización celular del sistema nervioso. En: BASES MOLECULARES DE LA NEUROTRANSMISION. Astro data, Venezuela. 486 pp.
23. Boulter, J., Hollmann, M., O'shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C. y Heinemann, S. 1990. Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science*. **249**:1033-1037.
24. Bouvier, M., Szatkowski, M., Amato, A y Attwell, D. 1992. The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature*. **360**:471-474.

25. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
26. Brandon, C. 1985. Retinal GABA neurons: Localization in vertebrate species using an antiserum to rabbit brain glutamate descarboxylase. *Brain Res.* **344**:286-295.
27. Brecha, N.C., Jhonson, L. D., Perchl y Wassle, H. 1988. Cholinergic amacrine cells of the rabbit retina contain glutamate descarboxylase and gamma aminobutyrate immunoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**:6187-6191.
28. Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppersberg, J. P., Günther, W., Seeburg, P. H. y Sakmann, B. 1992. Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science.* **257**:1415-1419.
29. 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.
30. Cameron, R.S y Rakic, P. 1991. Glial cell lineage in the cerebral cortex. A review and synthesis. *Glia* **4**: 124-137.
31. Choi, E., Xia, Z., Villacres, E. C. y Storm, D. R. 1993. The regulatory diversity of the mammalian adenylyl cyclases. *Curr. Op. Cell Biol.* **5**(2):269-273.
32. Choi, D. W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* **1**:623-634.
33. Chun, M. H. y Wassle, H. 1989. GABA-like immunoreactivity in the cat retina: electron microscopy. *J. Comp Neurol.* **279**:55-67.
34. Coleman, P. A., Massey, S. C. y Miller, R. F. 1986. Kynurenic acid distinguishes Kainate and Quisqualate receptors in the vertebrate retina. *Brain Res.* **381**:172-175.
35. Collingridge, G. L. y Singer, W. 1990. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *TIPS.* **11**:290-296.
36. Conner, J. D., Detwiler, P. B. y Sarthy, P. V. 1985. Ionic and electrophysiological properties of retinal Muller (glial) cells of the turtle. *J. Physiol.* **362**:79-92.
37. Cotman, C. W. e Iversen, L. L. 1987. Excitatory amino acids in the brain focus on NMDA receptors. *TINS.* **10**(7): 263- 265.

38. Cotman, C. W., Monaghan, D. T., Ottersen, O. P. y Storm-Mathisen, J. 1987. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *TINS*. **10** (7):273-280.
39. Curran, 1988. Fos and Jun. The AP-1 connection. *Cell* **55**:395-397.
40. Daw, N. W., Brunken, W. J. y Parkinson, D. 1989. The function of synaptic transmitters in the retina. *Ann. Rev. Neurosci.* **12**: 205- 225.
41. Dignam, J. D. Lebovitz, R. M. y Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**(5):1475-1489.
42. Dow, K. E., Guo, M. Kisilevsky, R. y Riopelle, R. J. 1993. Regenerative neurite growth modulation associated with astrocyte proteoglycans. *Brain Res. Bull.* **30**:461-467.
43. Dowling, J. E. 1970. Organization of vertebrate retinas. *Invest. Ophthalmol.* **9**:655-680.
44. Durand, G. M., Gregor, P., Zheng, X., Bennett, M. V. L., Uhl, G.R. y Zukin, R. S. 1992. Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:9359-9363.
45. Ebersolt, C., Pérez, M. y Bockaert, J. 1981. α_1 and β_2 adrenergic receptors in mouse brain astrocytes from primary cultures. *J. Neurosci Res.* **6**:643-652.
46. Egebjerg, J. Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I. y Heinemann, S. 1991. Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature.* **351**:745748.
47. Eubanks, J. H., Puranam, R. S., Klecker, N. W., Bettler, B., Heinemann, S. F. y McNamara, J. O. 1993. The gene encoding the glutamate receptor subunit GluR5 is located on human chromosome 21q21.1-22.1 in the vicinity of the gene for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:178-182.
48. Evans, T. McCarthy, K. D. y Harden, T. K. 1984. Regulation of cyclic AMP accumulation by peptide hormone receptors in immunocytochemically defined astroglial cells. *J. Neurochem.* **43**(1):131-138.
49. Farber, D y Adler, R. 1986. The Retina. A model for cell biology studies. Academic Press, INC. Orlando, USA. 363 pp.
50. French-Constant, C. y Raff, M. C. 1986. The oligodendrocyte type-2 astrocyte cell lineage is specialized for myelination. *Nature* **323**:335-338.

51. Fried, M y Crother, D. M. 1981. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acid Res.* **9**:6505-6525.
52. Gald, G. 1968. The molecular Basis of visual excitation. *Nature.* **219**:800-807.
53. Gard, A. L. y Pfeiffer, S. E. 1989. Oligodendrocyte progenitors isolated directly from developing telencephalon at a specific phenotypic stage. Myelinogenic potential in a defined environment. *Development.* **106**:119-132.
54. Gasic, G. P. y Hollmann, M. 1992. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **54**:507-536.
55. Gregor, P., Eshhar, N., Ortega, A. y Teichberg, V. I. 1988. Isolation, immunochemical characterization and localization of the kainate sub-class of glutamate receptor from chick cerebellum. *EMBO J.* **7**(9):2673-2679.
56. Gregor, P., Mano, I., Maoz, Il., McKeown, M. y Teichberg, V. I. 1989. Molecular structure of the chick cerebellar kainate-binding subunit of a putative glutamate receptor. *Nature.* **342**:689-692.
57. Hampson, D. R. y Wenthold, R. J. 1988. A kainic acid receptor from frog brain purified using domoic acid affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **263**(5): 2500-2505.
58. Hansson, E., Rönnbäck, L y Sellström, A. 1984. Is there a "Dopaminergic glial cells"? *Neurochem. Res.* **9**(5):679-689.
59. Hensley, S. H., Yang, X. y Wu, S. M. 1993. Identification of glutamate receptor subtypes mediating inputs to bipolar cells and ganglion cells in the tiger salamander retina. *J. Neurophys.* **69**(6): 2099-2107.
60. Hestrin, S. 1992. Developmental regulation of NMDA receptor-mediated synaptic currents at a central synapse. *Nature.* **357**:686-689.
61. Herb, A., Burnashev, N., Werner, P. Sakmann, B., Wisden, W. y Seeburg, P. H. 1992. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron.* **8**:775-785.
62. Hertz, L y Schousboe, A. 1986. Role of astrocytes in compartmentation of amino acid and energy metabolism. En: *ASTROCYTES, BIOCHEMISTRY, PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY OF ASTROCYTES. VOL II.* (Editado por Federoff, S. y Vernadakis, A.). Academic Press, Inc., Orlando. 179-208.

- 63.Hensley, S. H., Yang, X. y Wu, S. M. 1993. Identification of Glutamate receptor subtypes mediating inputs to bipolar cells in the Tiger Salamander retina. *J. Neurophys.* **69**(6):2099-2107.
- 64.Hollmann, M., Hartley, M. y Heinemann, S. 1991. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*. **252**:851-853.
- 65.Hollmann, M., O'shea-Greenfield, A., Rogers, S. W. y Heinemann, S. 1989. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*. **342**: 643-648.
- 66.Hösl, L., Hösl, E., Zehntner, C., Lehmann, R. y Lutz, T. W. 1982. Evidence for the existence of α and β adrenoceptors on cultured glial cell-an electrophysiological study. *Neurosci* **7**: 2867-2872.
- 67.Houamed, K. M., Kuljper, J. L., Gilbert, T. L., Haldeman, B. A., O'Hara, P. J., Mulvihill, E. R., Almers, W. y Hagen., F. S. 1991. Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science*. **252**:1318-1321.
- 68.Hubel, D. H. y Wiesel, T. N. 1960. Receptive fields of optic nerve fibres in the spider monkey. *J. Physiol*. **154**: 572-580. (Great Britain).
- 69.Hughes, P. J. y Michell, R. H. 1993. Novel inositol containing phospholipids and phosphates: their synthesis and possible new roles in cellular signalling. *Curr. Op. Neurobiol*. **3**:383-400.
- 70.Hume, R. I., Dingledine, R. y Heinemann, S. F. 1991. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science*. **253**:1028-1031.
- 69.Janzer, R. C. y Raff, M. C. 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. **325**:253-257.
- 70.Jensen, A. M. y Chiu, S. Y. 1991. Differential intracellular calcium responses to glutamate in type 1 and type 2 cultured brain astrocytes. *J. Neurosci*. **11**(6):1674-1684.
- 71.Jonas, P. y Sakmann, B. 1992. Glutamate receptor channels in isolated patches from CA1 and CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slices. *J. Physiol*. **455**:143-171.
- 72.Kabbadj, K. et al. (1993). Pregnenolone metabolism in rodent embryonic neurons and astrocytes. *Glia*. **7**:170-175.

- 73.Karp, S. J., Toshihiko, E., Ozawa, K. y Nakanishi, S. 1993. Molecular cloning and chromosomal localization of the key subunit of the human N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* **268**(5): 3728-3733.
- 74.Keinämen, K., Wisden, W., Sommer, B. Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T. A. Sakmann, B. y Seeburg, P. H. 1990. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science*. **249**:556-560.
- 75.Kettenmann, H., Backus, K. H. y Schachner, M. 1987. γ -aminobutyric acid opens Cl-channels in cultured astrocytes. *Brain Res.* **404**:1-9.
- 76.Kettenmann, H. y Schachner, M. 1985. Pharmacological properties of γ -aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate- induced depolarization in cultured astrocytes. *J. Neurosci.* **5**(12):3295- 3301.
- 77.Kimelberg, H. K. y Katz, D. M. 1985. High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. *Science* **228**:889-891.
- 78.Kuffler, S. W. 1953. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J. Neurophysiol.* **16**:37-68.
- 79.Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Morl, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. y Mishina, M. 1992. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* **358**:36-41.
- 80.Lamb, T. D. 1986. Transduction in vertebrate photoreceptors: the roles of cyclic GMP and calcium. *TINS.* **9**(5): 224-228.
- 81.Lamb, P. y McNight, S. L. 1991. Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *TIBS.* **16**:417-422.
- 82.Lerea, L. S. y McNamara, J. O. 1993. Ionotropic glutamate receptor subtypes activate *c-fos* transcription by distinct calcium-requiring intracellular signaling pathways. *Neuron.* **10**:31-41.
- 83.Lodge, D. y Johnson, K. M. 1990. Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonist. *TIPS.* **11**:81-86
- 84.LoPachin, R. M. y Aschner, M. 1993. Glial-neuronal interactions: relevance to neurotoxic mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **118**:141-158.
- 85.López, T., López-Colomé, A. M. y Ortega, A. 1994. AMPA/KA receptor expression in radial glia. *NeuroReport* (en prensa).
- 86.López-Colomé, A. M. 1981. High-affinity binding of L-Glutamate to chick retinal membranes. *Neurochem. Res.* **6**(9):1019-1033.

87. López-Colomé, A. M., Ortega, A. y Romo-de-Vivar, M. 1993. Excitatory amino acid-induced phosphoinositide hydrolysis in Müller glia. *Glia* 9:127-135.
88. López-Colomé, A. M. y Romo de Vivar, M. (1991). Excitatory amino acid receptors in primary cultures of glial cells from the retina. *Glia* 4:431-439.
89. López-Colomé, A. M. y Somohano, F. 1984. Localization of L- aspartate synaptic receptors in chick retinal neurons. *Brain Res.* 298:159-162.
90. Mc.Namara, J., Eubanks, J., McPherson, J. D., Wasmuth, J.J., Evans, G. A. y Heinemann, S. F. 1992. Chromosomal localization of human glutamate receptors genes. *J. Neurosci.* 12(7):2555-2562.
91. Marc, R. E., Liu, W., Kalloniatis, M., Raiguel, S. F. y Haesendonck, E. V. 1990. Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina. *J. Neurosci.* 10(12):4006-4034.
92. Masland, R. H. 1988. Amacrine cells. *TINS* 11:405-410.
93. Massey, S. C. y Miller, R. F. 1990. N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina. *J. Neurophys.* 63(1):16-30.
94. Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchido, K., Shigemoto, R. y Nakanishi, S. 1991. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature.* 349:760-765.
95. Mayer, M. L. y Miller, R. J. 1990. Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca²⁺ in mammalian neurons. *TIPS* 11:254-260.
96. Miller, R. F. y Slaughter, M. M. 1986. Excitatory amino acid receptors of the retina: diversity of subtypes and conductance mechanisms. *TINS.* 9:211-218.
97. Mobbs, P., Brew, H. y Attwell, D. 1988. Acuantitative analysis of glial cell coupling in the retina of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Brain Res.* 460:235-245.
98. Monyer, H., Seeburg, P. H. y Wisden, W. 1991. Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron* 6:799-810.
99. Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomell, H., Burnashev, N., Sakmann, B., y Seeburg, P. H. 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science.* 256:1217-1221.

- 100.Morgan, J. I. y Curran, T. 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**:421-451.
- 101.Morgan, S., Thompson, M. A. y Greenberg, M. E. 1991. CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science.* **252**:1427-1430.
- 102.Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R. Mizuno, N. y Nakanishi, S. 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature.* **354**:31-37.
- 103.Müller, F., Greferath, U., Wässle, H., Wisden, W. y Seeburg, P. 1992. Glutamate receptors expression in the rat retina. *Neurosci. Lett.* **138**:179-182.
- 104.Murphy, S y Pearce, B. 1987. Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neurosci.* **22**(2):381-394.
- 105.Mussen, G.L. y Rosen, S. 1973. Localization of carbonic anhydrase activity in the vertebrate. *Exp. Eye. Res.* **15**:105-119.
- 106.Nairn, A. C., Hemmings, H. C. y Greengard, P. 1985. Protein kinases in the brain. *Ann. Rev. Biochem.* **54**:931-976.
- 107.Nakanishi, S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* **258**:597-603.
- 108.Nakanishi, N., Axel, R. y Shneider, N. A. 1992. Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:8552-8556.
- 109.Nakanishi, N., Shneider, N. A. y Axel, R. 1990. A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron.* **5**:569-581.
- 110.Nathans, J. 1987. Molecular biology of visual pigments. *Ann. Rev. Neurosci.* **10**:163-194.
- 111.Newman, E. A. 1985. Membrane physiology of retinal glial (Müller) cells. *J.Neurosci.* **5**(8):2225-2239.
- 112.Newman, E. A. 1985. Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature* **317**: 809-811.
- 113.Newman, E. A. 1987. Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: a comparative study. *J. Neurosci.* **5**(8): 2423-2432.

114. Normberg, M. D. y Martínez-Hernández, A. 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* **161**:303-310.
115. Orkand, R. K., Nicholls, J. G. y Kuffler, S. W. 1966. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* **29**:788-806.
116. Ortega, A. y Teichberg, V. I. 1990. Phosphorylation of the 49-kDa putative subunit of the chick cerebellar kainate receptor and its regulation by kainatergic ligands. *J. Biol. Chem.* **265**(35): 21404-21406.
117. Palmer, E., Monaghan, D. T. y Cotman, C. W. 1989. Trans-ACPD, a selective agonist of the phosphoinositide-coupled excitatory amino acid receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **166**:585-587.
118. Pearce, B., Cambray-Deakin, M., Morrow, C., Grimble, J. y Murphy, S. 1985. Activation of muscarinic and of α_1 -adrenergic receptors on astrocytes results in the accumulation of inositol phosphates. *J. Neurochem.* **45**(5):1534-1540.
119. Pearce, B., Morrow, C. y Murphy, S. 1986. Receptors mediated inositol phospholipid hydrolysis in astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **121**:231-243.
120. Penner, R., Fasolato, C. y Hoth, M. 1993. Calcium influx and its control by calcium release. *Curr. Op. Neurobiol.* **3**:368-374.
121. Pickering, D. S., Thomsen, C., Suzdak, P. D., Fletcher, E. J., Robitaille, R., Salter, M. W., MacDonald, J. F., Huang, X. P. y Hampson, D. R. 1993. A comparison of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor coupled to phosphoinositide turnover. *J. Neurochem.* **61**(1):85-92.
122. Pieroni, J. P., Jacobowitz, O., Chen, J. y Lyengar, R. 1993. Signal recognition and integration by Gs-stimulated adenylyl cyclases. *Curr. Op. Neurobiol.* **3**:345-351.
123. Piomelli, D. 1993. Arachidonic acid in cell signaling. *Curr. Op. Cell Biol.* **5**(2): 274-280.
124. Pourcho, R. G. 1982. Dopaminergic amacrine cells in the cat retina. *Brain Res* **252**:101-109.
125. Rasmussen, K. E. 1974. The Muller cell: a comparative study of rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp. Eye. Res.* **19**:243-257.
126. Repke, H. y Maderspach, K. 1982. Muscarinic acetylcholine receptors on cultured glia cells. *Brain Res.* **232**:206-211.

127. Riepe, R. E. y Norenberg, M. D. 1978. Glutamine synthetase in the developing rat retina: an immunohistochemical study. *Exp. Eye. Res.* **27**:435-444.
128. Robinson, S. R. y Dreher, Z. 1990. Müller cells in adult rabbit retinae; morphology, distribution and implications for function and development. *J. Comparative Neurology* **292**:178-192.
129. Roussel, G., Delavroy, J., Nussbaun, J. y Mandel, P. 1979. Demonstration of a specific localization of carbonic anhydrase C in the glial cells of rat CNS by an immunohistochemical method. *Brain Res.* **160**:47-55.
130. Sakurada, K., Masu, M y Nakanishi, S. 1993. Alteration of Ca^{2+} permeability and sensitivity to Mg^{2+} and channel blockers by a single amino acid substitution in the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* **268**(1):410-415.
131. Schoepp, D., Bockaert, J. y Sladeczek, F. 1990. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *TIPS.* **11**:508-515.
132. Schreiber, E, Matthias, P, Muller, M. M. y Schaffner, W. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**(15): 6419.
133. Schnapf, J. L., y Baylor, D. A. 1987. How photoreceptor cells respond to light. *Sci Amer.* **256**(4): 40-47.
134. Schulman, H. 1993. The multifunctional. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. *Curr. Op. Cell Biol.* **5**(2):247-253.
135. Schwartz, E. A. 1993. L-glutamate conditionally modulates the K^{+} current of Müller glial cells. *Neuron* **10**:1141-1149.
136. Shigemoto, R., Nakanishi, S. y Mizuno, N. 1992. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an *in situ* hybridization study in adult and developing rat. *J. Comp. Neurobiol.* **322**:121-135.
137. Slaughter, M. M. y Miller, R. F. 1981. 2-amino-4-phosphonobutyric acid: A new pharmacological tool for retina research. *Science.* **211**:182-185.
138. Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T.A., Wisden, W. Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., Takagi, T., Sakmann, B. y Seeburg, P. H. 1990. Flip and flop: a cell specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* **249**:1580-1585.

- 139.Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R. y Seeburg, P. H. 1991. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* **67**:11-19.
- 140.Somohano, F., Roberts, P. J. y López-Colomé, A.M. 1988. Maturational changes in retinal excitatory amino acid receptors. *Dev. Brain. Res.* **42**:59-67.
- 141.Somogyi, P., Eshhar, N., Telchberg, V. I. y Roberts, J. D. B. 1990. Subcellular localization of a putative kainate receptor in Bergmann glial cells using a monoclonal antibody in the chick and fish cerebellar cortex. *Neurosci.* **35**(1):9-30.
- 142.Sonnenberg, J. L., Mitchelmore, C., Mcgregor-Leon, P. F., Hempstead, J., Morgan, J. I. y Curran, T. 1989. Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra y AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. *J. Neurosci. Res.* **24**:72-80.
- 143.Steward A, Bloomfield y Dowling, J. E. 1985. Roles of Aspartate and Glutamate in synaptic transmission in rabbit retina. I. Outer plexiform layer. *J. Neurophysiology.* **53**(4):699-713.
- 144.Steward A, Bloomfield y Dowling, J.E. 1985. Roles of aspartate and glutamate in synaptic transmission in rabbit retina. II. Inner plexiform Layer. *J. Neurophysiology.* **53**(4):714-725.
- 145.Stone, J. 1983. Parallel processing in the visual system. Plenum Press, New York. 149-264.
- 146.Sugihara, H., Moriyoshi, K., Ishii, T., Masu, M. y Nakanishi, S. 1992. Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem. and Biophys. Res. Communications.* **185**(3): 826-832.
- 147.Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R. y Nakanishi, S. 1992. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **8**:169- 179.
- 148.Tanabe, Y., Nomura, A. Masu, M., Shigemoto, R., Mizuno, N. y Nakanishi, S. 1993. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J. Neurosci.* **13**(4):1372- 1378.
- 149.Thomas, E. 1992. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Rev.* **17**:61-74.
- 150.Usovich, M.M., Gallo, V. y Cull-Candy, S.G. 1989. Multiple conductance channels in type-2 cerebellar astrocytes activated by excitatory amino acids. *Nature*, **339**:380-383.

151. Verdoorn, T. A., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H. y Sakmann, B. 1991. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* **252**:1715-1718.
152. Vogt, P. K. y Bos, T. J. 1989. The oncogene *jun* and nuclear signalling. *TIBS*. **14**:172-175.
153. Wada, K., Dechesne, C. J., Shimasaki, S., King, R. G., Kusano, K., Buonanno, A., Hampson, D. R., Banner, C., Wenthold, J. y Nakatani, Y. 1989. Sequence and expression of a frog brain complementary DNA encoding a kainate-binding protein. *Nature*. **342**:684-689.
154. Wald, G. 1968. The molecular basis of visual excitation. *Nature*. **219**:800-807.
155. Wassle, H. y Boycott, B. B. 1991. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.* **71**(2):447-480.
156. Watkins, J. C., Krosgaard-Larsen, P. y Honoré, T. 1990. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *TIPS*. **11**:25-33.
157. Watkins, J. C. y Olverman, H. J. 1987. Agonist and antagonists for excitatory amino acid receptors. *TINS*. **10**(7): 265-272.
158. Werner, P., Voigt, M., Keinänen, K., Wisden, W. y Seeburg, P.H. 1991. Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature*. **351**:742- 744.
159. Wisden, W. y Seeburg, P. H. 1993. Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr. Op. in Neurobiol.* **3**:291-298.
160. Wyllie, D. J. A., Mathie, A., Symonds, C.J. y Cull-Candy, S. G. 1991. Activation of glutamate receptors and glutamate uptake in identified macroglial cells in rat cerebellar cultures. *J. Physiol.* **432**:235-258.
161. Yamazaki, M., Araki, K., Shibata, A. y Mishina, M. 1992. Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* **183**(2):886-892.
162. Young, A. B. y Fagg, G. E. 1990. Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *TIPS*. **11**:126-133.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA