



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFEECTO DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES  
GLUTAMATÉRGICOS SOBRE LA SÍNTESIS DE  
ÓXIDO NÍTRICO EN LA RETINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A:

VIETMINH PAZ VILLAGRÁN

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ANA MARÍA LÓPEZ COLOMÉ



2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

**"Efecto de la activación de receptores glutamatérgicos  
sobre la síntesis de óxido nítrico en la retina"**

realizado por **Vietminh Paz Villagrán**

con número de cuenta **9455632-0** , pasante de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario	Dra. Ana María López Colomé
Propietario	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Propietario	Dr. Julio Morán Andrade
Suplente	Dra. Luisa Alba Lois
Suplente	M. en I.B.B. Rocío Alcántara Hernández

*Dr. Julio Morán Andrade*  
*[Firma]*  
*[Firma]*  
*[Firma]*

**Consejo Departamental de Biología**

*[Firma]*  
Dra. Edna María Suárez Díaz  
Coordinadora de Licenciatura

A mis papás, Elsy y Luis, por su cariño y el gran apoyo en todas  
las cosas que hago.

A mi hermanito Pablo, por tenerme tanta paciencia  
y ayudarme siempre.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Ana María López Colomé, en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M. Se recibió apoyo del donativo IN-210998 de DGAPA-UNAM.

Vietminh Paz Villagrán fue becaria del Programa de Iniciación Temprana a la Investigación y a la Docencia (Fundación U.N.A.M.), durante el período de septiembre a agosto de 1998 ; y del Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (Fundación U.N.A.M.), durante el período de noviembre a abril de 1999.

## Agradecimientos.

A la Dra. Ana María López Colomé por su amistad, apoyo y paciencia en la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dr. Julio Morán Andrade, Dra. Luisa Alba Lois y M. en I.B.B. Rocío Alcántara Hernández, por sus comentarios y sugerencias.

A mis compañeros del laboratorio, Edith, Gaby, Violeta, Ana, Irene, Israel y Froy, por su amistad y gran ayuda.

A mis amigos de la fac, Chela, Janik, Dago, Andrés, Toño, Fer, Demon, Luis, Lau, Luisa, Mau y, sobre todo al Chups.

## ÍNDICE

Abreviaturas.....	3
Resumen.....	5
<b>I. Introducción</b>	
El ON como neurotransmisor.....	7
Síntesis del ON.....	11
Sintasa del óxido nítrico (NOS).....	11
Localización de la NOS en la retina.....	17
El ON como transmisor en la retina.....	19
El glutamato como transmisor en la retina.....	20
Receptores de glutamato acoplados a la síntesis de ON.....	22
Estimulación de la síntesis de ON por la activación de los receptores de glutamato.....	24
<b>II. Objetivo.....</b>	<b>27</b>
<b>III. Materiales y Métodos</b>	
Extracción e incubación del tejido de embriones de 8 y 14 días de desarrollo embrionario y de pollos de dos días de edad.....	28
Cuantificación de citrulina (medida indirecta de la síntesis de ON).....	28
Efecto del NMDA sobre la síntesis de ON.....	29
Efecto de diferentes concentraciones de NMDA sobre la síntesis de ON.....	29
Efecto del MK-801 sobre la síntesis de ON.....	30

Efecto de diferentes concentraciones de KA sobre la síntesis de ON.....	30
Estadística.....	30
Reactivos.....	30

#### IV. Resultados

1. Síntesis de ON en condiciones basales.....	31
2. Efecto del NMDA sobre la síntesis de ON	
A. Retina de embriones de 14 días de desarrollo.....	31
B. Retina de pollos de 2 días de edad.....	35
C. Efecto de diferentes concentraciones de NMDA sobre la síntesis de ON.....	35
3. Efecto del MK-801 sobre la síntesis de ON.....	35
4. Efecto del KA sobre la síntesis de ON.....	38

V. Discusión y Conclusiones.....	41
----------------------------------	----

Bibliografía.....	47
-------------------	----



## ABREVIATURAS

ACPD = Ácido *trans*-(±)-1-amino 1,3-ciclopentanodicarboxílico.

AMPA = Ácido (RS)- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico.

Asp = Aspartato.

BH<sub>4</sub> = 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina.

BOAA =  $\beta$ -oxalil-amino-L-alanina.

CaM = Calmodulina.

CaMKII = Cinasa II dependiente de CaM.

Ci = Curie, unidad de radioactividad.

CNQX = L-6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3 diona.

cNOS = NOS constitutiva.

DE = Desarrollo embrionario.

DO = Ácido domoico.

E8 = Embriones de 8 días DE.

E14 = Embriones de 14 días DE.

EDTA = Ácido etilen-diamino-tetra acético.

FAD = Flavín adenina dinucleótido.

FMN = Flavín mononucleótido.

FRDE = Factor relajante derivado del endotelio.

GMPc= Guanosin 3',5' monofosfato cíclico.

Hepes = Ácido N(2-hidroxietyl)piperazin-N'-(2-etanosulfónico).

iGluR = Receptores ionotrópicos.

iNOS = NOS inducible.

IP<sub>3</sub> = Inositol 1,4,5-trifosfato.

KA = Kainato.

L-Glu = L-glutamato.

mGluR = Receptor metabotrópico glutamatérgico.

MK-801 = Maleato de dizocilpina.

mRNA = RNA mensajero.

NADPH = Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NANC = No-adrenérgicos y no-colinérgicos.

NMDA = N-metil-D-aspartato.

NNA = N-nitro-L-arginina.

NOS = Sintasa del ON.

ON = Óxido nítrico.

PH2 = Pollos de 2 días de edad.

PKC = Proteína cinasa C.

SNC = Sistema nervioso central.

## RESUMEN

El óxido nítrico (ON) es un gas con una vida media de segundos (Snyder y Brecht, 1992), que desempeña diversas funciones en las células. El ON actúa como mensajero en tres importantes sistemas: en el sistema inmune, como mediador de algunos factores citotóxicos de neutrófilos y macrófagos (Kuo y Schroeder, 1995); en el sistema cardiovascular, como un factor relajante derivado del endotelio (FRDE), como mediador de la agregación de plaquetas (Stewart et al., 1994) y del incremento local del flujo sanguíneo cuando aumenta el metabolismo cerebral (Faraci y Brian, 1994). En el sistema nervioso central (SNC) el ON actúa como neurotransmisor (Snyder y Brecht, 1992; Dawson y Snyder, 1994), relacionado con procesos de neurotoxicidad (Dawson, 1994), de potenciación a largo plazo (Harley et al., 1992) y de depresión a largo plazo (Shibuki y Okada, 1991).

En el cerebelo, el hipocampo y la retina, la estimulación de los receptores de glutamato del tipo NMDA aumenta la síntesis de ON, que a su vez activa a la guanilato ciclasa soluble y eleva la concentración de GMPc.

En este trabajo se cuantificó la síntesis de ON durante el desarrollo embrionario (DE) de la retina de pollo, con el fin de establecer el tipo de receptores ionotrópicos de glutamato involucrados en el proceso. La síntesis de ON alcanza un máximo en la retina de embriones de 8 y 14 días de DE y disminuye gradualmente hacia el día de la eclosión, lo que demuestra cambios en la actividad de la NOS.

Se estudió el efecto del NMDA sobre la síntesis de ON, estimulando la retina con diferentes concentraciones de este agonista del glutamato. A concentraciones de 50 y 100 $\mu$ M, el NMDA aumentó la síntesis de ON respecto al control (sin drogas); 500 $\mu$ M y 1mM de NMDA no tuvieron efecto, mientras que a una concentración de 5mM, el NMDA inhibió considerablemente la síntesis de ON.

Con el fin de establecer la participación de los receptores ionotrópicos de glutamato del tipo NMDA en la regulación de la síntesis de ON en condiciones basales, se probó el efecto del MK-801, bloqueador del canal iónico de los receptores del tipo NMDA. El compuesto no modificó la síntesis basal de ON, pero abolió la inhibición producida por NMDA 5mM en retina de embriones de 14 días de DE.

Se investigó la posible participación de otros tipos de receptores de glutamato en la regulación de la síntesis de ON. Se observó que el efecto del KA, agonista de los receptores de tipo AMPA/KA, fue similar al efecto del NMDA: concentraciones de 50 $\mu$ M y 100 $\mu$ M estimularon la síntesis de ON sobre el control; 500 $\mu$ M y 1mM no tuvieron efecto, y a una concentración de 5mM, se observó una inhibición de la síntesis de ON aunque, en este caso, podría deberse a un efecto citotóxico.

La mayor síntesis de ON en etapas tempranas del DE y el aumento de la síntesis al estimular los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y AMPA/KA, sugieren que el glutamato podría participar en procesos de diferenciación en la retina a través de la regulación de la síntesis de ON.

## **El ON como neurotransmisor**

El óxido nítrico (ON) es un gas con vida media de tan solo unos segundos (Snyder y Bredt, 1992), que desempeña diversas funciones en las células. El ON actúa como mensajero en tres importantes sistemas: en el sistema inmune, actúa como mediador de algunos factores citotóxicos de neutrófilos y macrófagos (Kuo y Schroeder, 1995); en el sistema cardiovascular, actúa como un factor relajante derivado del endotelio (FRDE), como mediador de la agregación de plaquetas (Stewart et al., 1994) y del incremento local del flujo sanguíneo cuando aumenta el metabolismo cerebral (Faraci y Brian, 1994). En el sistema nervioso central (SNC) el ON actúa como neurotransmisor (Snyder y Bredt, 1992; Dawson y Snyder, 1994), y se relaciona con procesos de neurotoxicidad (Dawson, 1994), de potenciación a largo plazo (Harley et al., 1992) y de depresión a largo plazo (Shibuki y Okada, 1991).

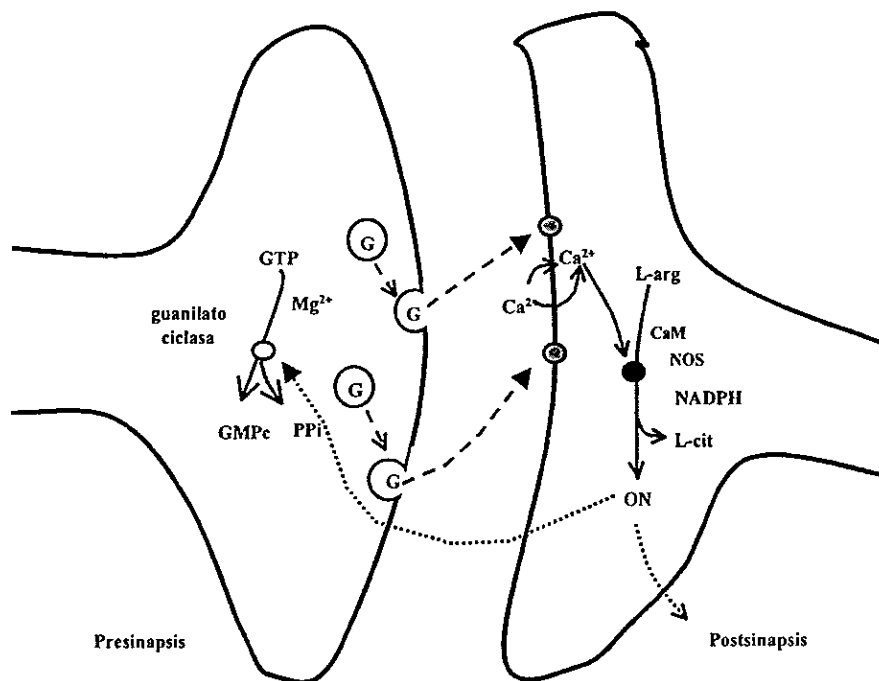
En el sistema nervioso periférico, el ON es el neurotransmisor liberado por nervios no-adrenérgicos y no-colinérgicos (NANC). Los precursores de esta idea fueron Gillespie y colaboradores, a partir de estudios en el músculo anocóxico de roedor y en el músculo retractor del pene de bovino. En este sistema, la estimulación de nervios NANC (en presencia de agentes bloqueadores adrenérgicos) causa la relajación de los músculos, efecto que no puede atribuirse a ningún transmisor conocido. Asimismo se demostró que la hemoglobina es un antagonista muy potente de este efecto, y que el GMPc (guanosin 3',5' monofosfato cíclico) es el segundo mensajero responsable de la relajación. Estudios posteriores demostraron que, tanto el

efecto relajante del llamado “factor inhibidor” como el del factor relajante derivado del endotelio (FRDE) en respuesta a la estimulación del nervio, se bloquean por inhibidores de la sintasa del ON (NOS) no sólo en estos músculos, sino también en muchos otros (Garthwaite, 1991). En concordancia con estos resultados, la NOS se ha localizado en fibras nerviosas que inervan al intestino, a la retina, a la médula adrenal y a vasos sanguíneos (Bredt et al., 1990).

El efecto de muchos vasodilatadores sobre el músculo liso vascular se debe a la activación de la NOS endotelial y a la subsecuente liberación del ON o FRDE que actúa a nivel del músculo liso vascular (Schmidt y Walter, 1994). El ON reacciona con el ión ferroso del grupo prostético hemo de la guanilato ciclasa soluble, activando así a la enzima; el resultado es el incremento de GMPc, que a su vez induce la relajación del músculo liso vascular así como la inhibición de la adhesión y agregación de las plaquetas (Moncada y Higgs, 1993).

En el sistema nervioso se ha propuesto dos modelos para explicar la acción del ON. El primero, basado en el efecto del ON sobre los nervios NANC periféricos, propone que el ON se sintetiza en la presinapsis, como respuesta a los potenciales de acción y al aumento consecuente en la concentración intracelular de calcio ( $Ca^{2+}$ ); el ON formado se difundiría a sus células blanco. Hasta ahora, este mecanismo sólo se ha demostrado en las células del músculo liso (Martin y Gillespie, 1990).

El segundo modelo está representado por las sinapsis glutamatérgicas, en las que el ON opera de una manera diferente (Figura 1). El ON se forma



**Figura 1.** Sinapsis glutamatergicas. En la presinapsis se libera glutamato (G), este neurotransmisor se difunde e interactúa con los receptores NMDA ( $\otimes$ ) de la postsinapsis que están acoplados a canales de  $Ca^{2+}$ . El complejo  $Ca^{2+}$  / CaM activa a la NOS. El ON sintetizado se difunde e interactúa con las células cercanas, como la neurona presináptica. El ON estimula a la guanilato ciclasa y la formación de GMPc.

en la postsinapsis por la activación de los receptores a glutamato, y activa a la guanilato ciclasa soluble en las estructuras anatómicamente cercanas: la terminal presináptica y los procesos astrocíticos (Garthwaite, 1991). La identificación de las isoformas neuronal y vascular de la NOS, sugiere que el ON puede actuar también como un mensajero en la comunicación intercelular, incluyendo la neurotransmisión.

Una vez formado, el ON es un gas altamente reactivo debido a su electrón no apareado, y es muy poco soluble en agua. Su vida media en los tejidos varía de 10 a 60 segundos (Kiechle y Malinski, 1993) y se difunde rápidamente a través de las membranas celulares.

La idea de que un gas tóxico e inestable funcione como transmisor genera muchas preguntas relacionadas con la naturaleza de la neurotransmisión. Así tanto el ON, como el monóxido de carbono (CO) y el sulfuro de hidrógeno (SH), gases propuestos como neurotransmisores, constituyen una excepción a la definición clásica de un *neurotransmisor*. Las diferencias entre el ON y los neurotransmisores tradicionales son numerosas: el ON no se almacena en las células, no se libera por excitosis, no existe un proceso activo que termine su acción, no interactúa con receptores específicos en la membrana de la célula blanco, y regula la función de las terminales presinápticas a la neurona en la que se sintetiza.

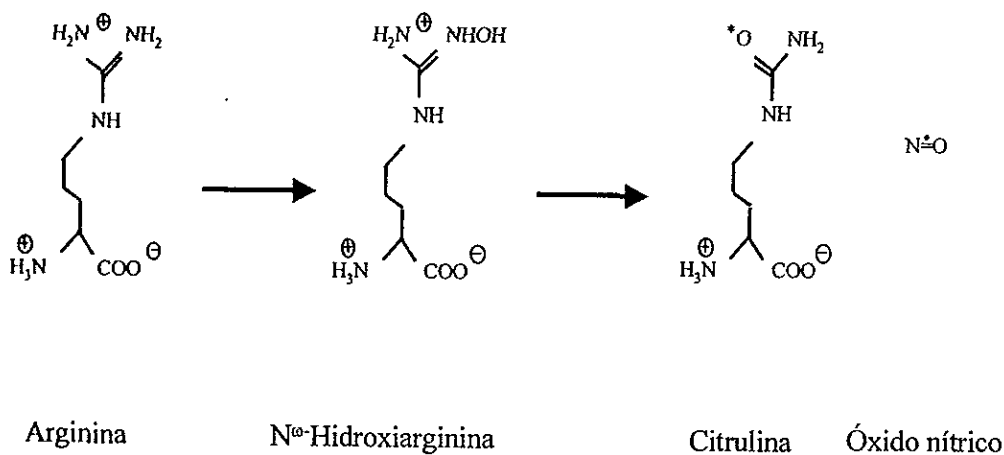


### Síntesis del ON.

El ON se genera por la actividad de la NOS a partir de la región terminal, nitrógeno guanidino, de la L-arginina. La NOS requiere de 5 electrones para la síntesis de ON y L-citrulina; como producto intermedio de esta reacción se obtiene la  $N^G$ -hidroxi-L-arginina (Marletta, 1994) (Figura 2). La NOS es una enzima oxidativa poco común, ya que la mayoría de estas enzimas requieren de 1 a 2 electrones para funciones similares. Los cofactores requeridos para la reacción son la calmodulina (CaM), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) y flavin adenina dinucleótido (FAD) o flavin mononucleótido (FMN; Dawson y Snyder, 1994; Morris y Billiar, 1994). El grupo hemo de la NOS reacciona con el monóxido de carbono para formar moléculas que absorben la luz a 445 nm, lo que indica que la NOS es una enzima del tipo citocromo P-450 (Dawson y Snyder, 1994). El ON formado por la NOS parece interactuar con el grupo hemo de esta enzima, provocando la inhibición de la síntesis del propio ON, lo que constituye un mecanismo de regulación por retroalimentación negativa (Rengasamy y Johns, 1993).

### Sintasa del óxido nítrico (NOS)

La NOS existe en tres isoformas (Tabla 1). Dos de ellas, neuronal (NOS-I o nNOS) y endotelial (NOS-III o eNOS) son constitutivas y se designan como cNOS. La tercera isoforma (NOS-II) es inducible, iNOS, y



**Figura 2.** Vía de síntesis del ON. La conversión de L-arg a ON y L-cit por la actividad de la NOS requiere de la oxidación de 5 electrones. En el primer paso se requiere la oxidación de 2 electrones y hay una hidroxilación que forma a la N<sup>o</sup>-hidroxi-L-arg. En el segundo paso se requiere la oxidación de 3 electrones para formar la L-cit y el radical libre ON que se forma a partir de la N<sup>o</sup>-hidroxi-L-arg.

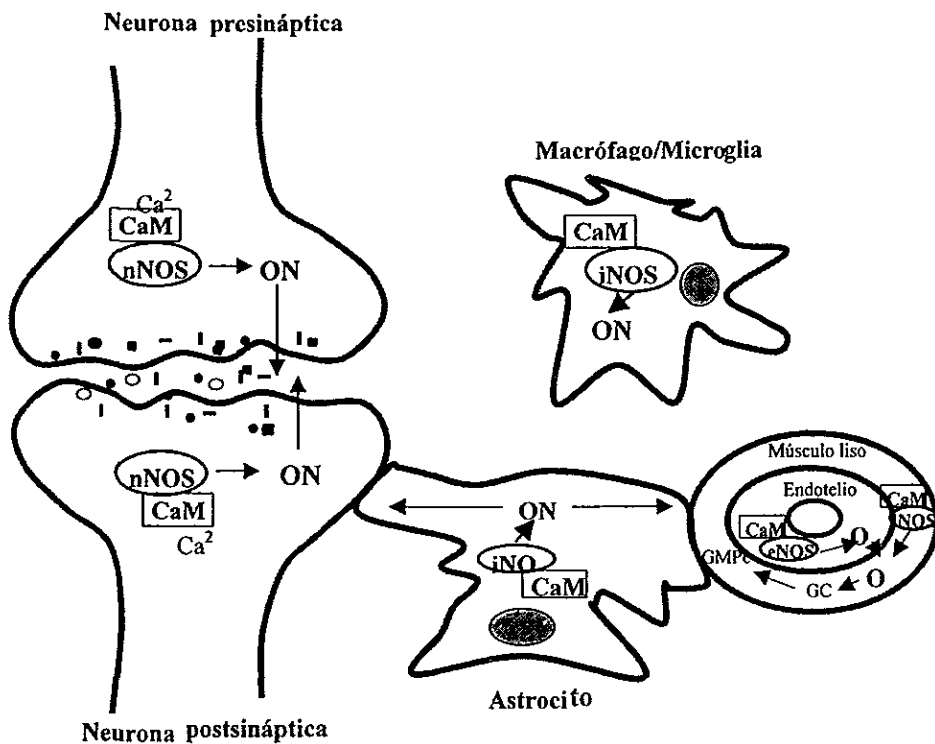
**Tabla I.** Isoformas de la sintasa del óxido nítrico (NOS).

Nomenclatura recomendada <sup>a</sup>	Designaciones previas	Descripción	Distribución en los tejidos <sup>b</sup>
NOS neuronal (nNOS)	NOS tipo I NOS-I b-NOS nc-NOS	NOS constitutiva identificada en neuronas regulada por Ca <sup>2+</sup> /CaM citosol>membranas	Neuronas del sistema nervioso central y periférico, el músculo esquelético, ciertas células epiteliales, células de la mácula renal, células pancreáticas.
NOS inducible (iNOS)	NOS tipo II NOS-II macNOS hepNOS	NOS inducible identificada en macrófagos no depende de CaM citosol>membranas	Macrófagos, células Kupffer, hepatocitos, fibroblastos, células gliomas, microglia, astrocitos, miocardio, células del músculo liso, pulmón, células mesangiales, células endoteliales, condrocitos articulares, neutrófilos polimorfonucleares.
NOS endotelial (eNOS)	NOS tipo III NOS-III ecNOS	NOS constitutiva identificada en el endotelio regulada por Ca <sup>2+</sup> /CaM membranas>citosol	Células endoteliales, neuronas CA1, neutrófilos, células precursoras, plaquetas, células de la médula adrenal, astrocitos, células del epitelio tubular del hígado, linfocitos B y T.

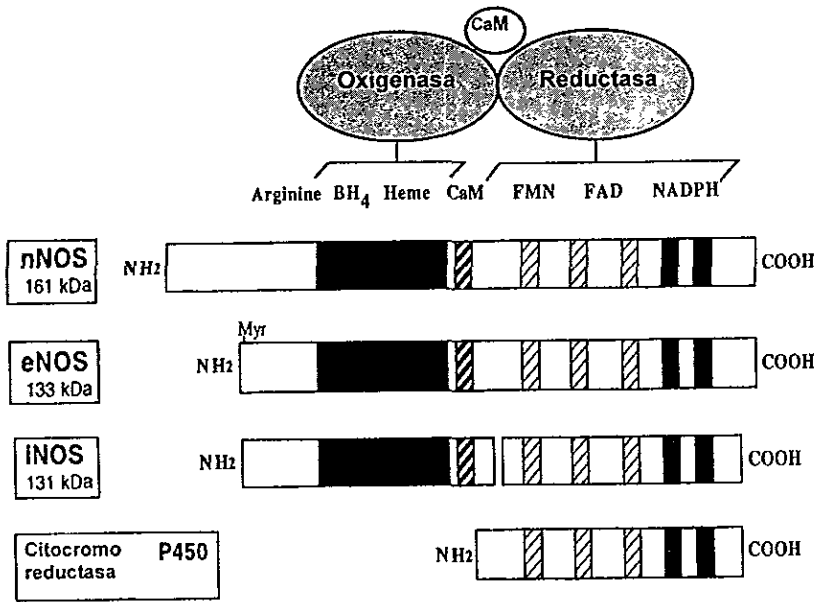
<sup>a</sup> de Moncada et al. (1997)

<sup>b</sup> ejemplos

se expresa en células activadas tales como macrófagos, en donde la enzima se activa por señales inmunológicas (Bredt y Snyder, 1994a; Knowles y Moncada, 1994; Garthwaite, 1995) (Figura 3). La nNOS y la eNOS particulada comparten los cofactores y sustratos ya mencionados; la eNOS soluble sólo requiere NADPH y el complejo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . La iNOS soluble de neutrófilos requiere de todos los cofactores excepto CaM, y la iNOS particulada únicamente requiere NADPH (Figura 4). Por otra parte, todas las isoformas de la NOS se inhiben por análogos de la L-arginina como la  $N^G$ -monometil-L-arginina (Harald et al., 1993). Los genes que codifican para cNOS y iNOS se localizan en diferentes cromosomas humanos: la endotelial en el 7, la neuronal en el 12 y la iNOS en el 17. La unión de CaM y  $\text{Ca}^{2+}$  es el mecanismo más importante de control de la cNOS, sin embargo, no es esencial para la activación de la iNOS, ya que el control de esta última se da a nivel de la expresión de su mRNA (Nathan y Xie, 1994ab). La activación de la cNOS es breve (horas), y va seguida de una fase refractaria (*lag phase*) de muchas horas; el ON liberado por la activación de la iNOS, en cambio, puede mantenerse por varios días, tal vez porque la cantidad de ON formado por la iNOS es mucho mayor que la formada por la cNOS. La iNOS se estimula por citocinas, incluyendo lipopolisacárido, interferón y el factor de necrosis tumoral (Nathan y Xie, 1994ab). Estas diferencias de regulación entre cNOS y iNOS explican sus distintas funciones en la homeostasis: mientras que las isoformas de la cNOS regulan fenómenos a corto plazo, la iNOS participa en funciones citotóxicas largas y duraderas así como en reacciones inmunológicas (Nathan y Xie, 1994ab).



**Figura 3.** El ON en el sistema nervioso. En respuesta a un estímulo se incrementa la concentración del  $Ca^{2+}$  intracelular, se activa la CaM unida a la nNOS o eNOS y se sintetiza ON. En neuronas, el ON se puede sintetizar en la pre- o en la postsinapsis, y actuar como neurotransmisor. En células endoteliales el ON sintetizado puede producir una relajación en las células del músculo liso, a través de la estimulación de la guanilato ciclasa (GC) que genera GMPc. La iNOS se activa en respuesta a una variedad de estímulos y sintetiza ON en macrófagos, microglia y astrocitos.



**Figura 4.** Organización de los dominios de la NOS. La NOS contiene 2 dominios: oxigenasa y reductasa. El dominio oxigenasa contiene sitios de unión para heme, L-arg y BH<sub>4</sub> y es responsable de la oxidación del sustrato L-arg. El dominio reductasa tiene sitios de unión para NADPH y flavinas (FMN y FAD). El dominio para CaM se localiza entre los dominios oxigenasa y reductasa. Las 3 isoformas de la NOS tienen una estructura del dominio reductasa similar a la del citocromo P450.

### **Localización de la NOS en la retina**

Tanto la NOS como la NADPH diaforasa catalizan la síntesis de ON, por lo que se ha propuesto que la NOS y la NADPH diaforasa pudieran ser la misma enzima (Hope et al., 1991). La reducción del azul de tetrazolio por la actividad enzimática de la NADPH diaforasa en presencia de NADPH, se ha utilizado como indicador de la presencia de la NOS (Dawson et al., 1991a); esta tinción ha permitido determinar la amplia distribución de la enzima (Vincent y Hope, 1992). La actividad de la NOS y de la NADPH diaforasa se ha observado en la retina de muchas especies (Sandell, 1985; Sagar, 1986; Provis y Mitrofanis, 1990). En la retina de ratas y ratones, la NOS se localiza de manera predominante en las células amacrinas, en células amacrinas desplazadas a la capa de células ganglionares, en algunas células bipolares de la capa nuclear interna y en las capas plexiformes externa e interna (Huang et al., 1993; Yamamoto et al., 1993b). En la retina, en particular en células horizontales H1 de peces teleósteos, se ha identificado tanto la NADPH diaforasa (Liepe et al., 1994; Weiler y Kewitz, 1993) como la NOS (Liepe et al., 1994). En la retina humana, se ha demostrado la expresión del mRNA para la cNOS y la iNOS (Park et al., 1994).

La actividad de la NOS dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM se induce por denervación parasimpática pterigopalatina en las células ganglionares de la retina, en axones de las fibras nerviosas de la retina y en el nervio óptico de la rata (Yamamoto et al., 1993a). El descubrimiento de la actividad de la NOS (a través de la actividad de la diaforasa o por análisis de Southern blot

utilizando cDNA) en el desarrollo del tectum de pollo próximo a los axones de la retina (Williams et al., 1994), permitió sugerir que la NOS juega un papel importante en el desarrollo de la retina. Existe evidencia de que las isoformas nNOS y eNOS están involucradas en la sinaptogénesis de la retina, ya que se demostró la presencia de estas enzimas en algunas poblaciones neuronales (células amacrinas y células ganglionares) en diferentes etapas del desarrollo embrionario del pollo (Goureau et al., 1997).

La presencia de NOS en los fotorreceptores no está claramente demostrada. Aunque en estudios inmunocitoquímicos y por la técnica histoquímica basada en la actividad de la NADPH diaforasa no se había comprobado actividad de la NOS dentro de los fotorreceptores, se identificó actividad de la cNOS en extractos de segmentos externos de fotorreceptores de bovino (Venturini et al., 1991). Esta discrepancia podría deberse a diferencias en las condiciones experimentales, o bien, a la sensibilidad limitada de la tinción para la NADPH diaforasa. Por otra parte, en un estudio en el cual la actividad de la NADPH diaforasa de la retina de bovino se midió indirectamente, a través del cambio en la absorción de oxihemoglobina debido a su oxidación a metahemoglobina por la acción del ON, se determinó que la enzima depende de  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM, requiere NADPH, utiliza a la L-arginina como sustrato y se inhibe por análogos de la misma (Venturini et al., 1991), propiedades que corresponden a la cNOS. Otros investigadores localizaron a la cNOS, mediante anticuerpos específicos, en regiones elipsoideas del segmento interno de los receptores de bovino. La guanilato ciclasa soluble se localiza muy cerca de los cuerpos celulares de



los conos de la retina (Koch et al., 1994). Estos descubrimientos sugieren que la NOS puede tener un papel neuromodulador en la transducción visual.

En la retina de pollo, estudios recientes empleando histoquímica basada en la actividad de la NADPH-diaforasa e inmunohistoquímica, demuestran la presencia y actividad de la nNOS y eNOS en diferentes poblaciones neuronales (fotorreceptores, células amacrinas y células ganglionares) así como en regiones sinápticas de la misma (Paes de Carvalho et al., 1996; Goureau et al., 1997).

### **El ON como transmisor en la retina**

Aunque la función del ON y de la elevación subsecuente de la concentración de GMPc en la retina apenas empieza a explorarse, se ha demostrado que modula la función de canales iónicos en las células horizontales (Miyachi et al., 1990), en células bipolares (Shiells y Falk, 1992), en fotorreceptores (Kurenyy et al, 1994; Noll et al.,1994) y en células ganglionares (Ahmad et al., 1994); además, participa en los efectos citotóxicos provocados por isquemia en la retina (Zeevalk y Nicklas, 1994). La NOS se ha identificado también en otros tipos celulares que tienen contacto con las células horizontales, como son los fotorreceptores y las células bipolares (Liepe et al., 1994). Así, el ON y el GMPc tienen efectos moduladores en las sinapsis eléctricas entre las células horizontales, que constituyen la vía más importante de comunicación entre ellas. Tanto la estimulación de la NOS con L-arginina, como la aplicación de análogos del GMPc inhiben el acoplamiento

eléctrico entre las células (DeVries y Schwartz, 1989; McMahon, 1994b; Miyachi et al., 1990, 1991).

En neuronas del cerebro, el ON induce una disminución de la respuesta de los receptores de tipo AMPA y NMDA (Crepel y Jaillard, 1990; Manzoni et al., 1992; Shibuki y Okada, 1991). En la retina, la vía ON/GMPc modula a los receptores AMPA de las células horizontales, lo que provoca la reducción de su respuesta al glutamato (McMahon y Ponomareva, 1996). Este mecanismo podría servir para modular la sensibilidad sináptica y proteger a las células horizontales de la excitotoxicidad. Por otro lado, dada la amplia distribución de las enzimas responsables de la síntesis del ON y de los receptores AMPA en la retina, podría pensarse que este mecanismo interviene ampliamente en la transmisión sináptica en este tejido (McMahon y Ponomareva, 1996).

### **El glutamato como transmisor en la retina**

El glutamato se considera el neurotransmisor excitador más importante en el SNC. En la retina ejerce importantes influencias tróficas sobre el desarrollo y diferenciación de las neuronas, el crecimiento de neuritas y el desarrollo de los conos de crecimiento, así como en la supervivencia, migración y estratificación celular (Lipton y Kater, 1989; Lauder, 1993; Davenport et al., 1994). El glutamato ejerce muchos de estos efectos alterando la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Pearce et al., 1987; Rashid y Cambray-Deakin, 1992; Hartley et al., 1993; Komuro y Rakic, 1993) a través de la activación de dos clases de receptores ionotrópicos: NMDA y

no-NMDA o AMPA/KA. La permeabilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores de NMDA está bien establecida (MacDermott et al., 1986; Mayer y Westbrook, 1987; Ascher y Nowak, 1988; Bliss y Collingridge, 1993) y se ha demostrado que los receptores AMPA/KA también pueden formar canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  en varios tipos de neuronas y células gliales (Murphy y Miller, 1989; Iino et al., 1990; Gilbertson et al., 1991; Pruss et al., 1991; Burnashev et al., 1992a). Tanto las propiedades eléctricas como la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de los receptores ionotrópicos dependen de las subunidades que los componen. Hasta la fecha, se ha clonado 4 diferentes subunidades de los receptores de glutamato activados preferentemente por AMPA: GluR1, GluR3 y GluR4, que forman canales que son permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que la subunidad GluR2 sola o en combinación con otras subunidades, tiene una baja permeabilidad a este catión (Hollmann et al., 1991; Burnashev et al., 1992b). Las subunidades de los receptores a glutamato con alta afinidad por el KA, GluR5-7, son moderadamente permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ , a través de un mecanismo similar al de los receptores a AMPA GluR2 (Burnashev et al., 1995). Los canales de los receptores a NMDA y AMPA/KA difieren entre sí, en que los de NMDA, y no así los de AMPA/KA, están bloqueados por  $\text{Mg}^{2+}$  en condiciones fisiológicas (potenciales de membrana negativos) por lo que se requiere de una despolarización previa para su activación (Mayer et al., 1984). Por lo anterior, en etapas tempranas del desarrollo, los receptores de AMPA/KA son la principal vía para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las neuronas (Allcorn et al., 1996).

El glutamato y sus análogos, tales como el KA y el NMDA, producen efectos excitotóxicos en algunos tipos celulares como resultado del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales de los receptores AMPA/KA y NMDA (Brorson et al., 1994; Yin et al., 1994). El KA, agonista en los receptores AMPA/KA, es una excitotoxina muy potente tanto en el cerebro como en la retina de los vertebrados (Schwarcz y Coyle, 1977; Ehlich y Morgan, 1980; Ingham y Morgan, 1983; Olney et al., 1986, Catsicas y Clarke, 1987). En el cerebro anterior de la rata, la densidad de los receptores NMDA y AMPA/KA es mayor en etapas tempranas del desarrollo y declina hacia la edad adulta (60 días; McDonald et al., 1988; Insel et al., 1990; Miller et al., 1990). Pellegrini-Giampietro y colaboradores (1991,1992) demostraron que en el cerebro de rata, la relación entre los mRNAs que codifican para los receptores de glutamato del tipo AMPA/KA, permeables y e impermeables al  $\text{Ca}^{2+}$ , decrece con la edad. Estos datos sugieren que la permeabilidad diferencial al  $\text{Ca}^{2+}$  de los receptores AMPA/KA, que depende del tipo de cadenas proteicas que los integran, podría jugar un papel importante durante el desarrollo del SNC. En la retina de pollo existen diferencias claras, en etapas tempranas del desarrollo embrionario (7 días) los receptores AMPA están en mayor densidad, declinando en un 50% los días subsecuentes; los receptores L-glutamato (L-Glu) se encuentra en bajas densidades hasta el día 11 del desarrollo embrionario, lo mismo se observa para los receptores L-aspartato (Asp) y NMDA observándose un incremento en su densidad los días 14 y 18, respectivamente. Somohano y colaboradores (1988) demostraron que estos receptores sufren un incremento en la especificidad farmacológica, mientras

que sólo en los receptores AMPA existe un cambio importante en la afinidad durante la ontogenia.

### **Receptores de glutamato acoplados a la síntesis de ON.**

Los aminoácidos excitadores representados por el glutamato, juegan un papel esencial en fenómenos importantes tales como la memoria y la neurotoxicidad. Los receptores de glutamato tienen una función clave en el modelo elemental de aprendizaje y en la potenciación a largo plazo (Kennedy, 1989; Collingridge y Singer, 1990).

En el cerebelo y en el hipocampo, la inducción de la síntesis del ON se produce a través de la estimulación de los receptores de glutamato del tipo N-metil D-aspartato (NMDA); el ON formado, activa a la guanilato ciclase soluble (Garthwaite, 1991; Garthwaite et al., 1988) y eleva, así, la concentración de GMPc (Figura 1). El ON participa en procesos como la interacción neurona-glia (Garthwaite, 1991), la plasticidad sináptica (Gally et al., 1990) y, especialmente, la depresión a largo plazo (Shibuki y Okada, 1991) y la desensibilización de los receptores al ácido (RS)- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) en el cerebelo (Ito y Karachot, 1990).

A través de la cuantificación de GMPc en rebanadas de cerebro, se ha demostrado que los agonistas del glutamato en los receptores ionotrópicos (iGluR), tales como NMDA, AMPA y KA (kainato), activan a la NOS mediante la entrada de calcio del espacio extracelular (Garthwaite y Garthwaite, 1989; Garthwaite et al., 1988; Bredt y Snyder, 1989; Southam et

al.,1991;). Asimismo, la activación de los receptores metabotrópicos (mGluR), en especial por el ácido *trans*-(±)-1-amino1,3-ciclopentanodicarboxílico (ACPD; Palmer et al., 1989), acoplados al sistema de transducción de la hidrólisis de fosfoinosítidos, induce la síntesis de GMPc a través de la activación de la NOS (Okada, 1992), por lo que se sugiere que la estimulación de la NOS por la activación de los mGluR no depende del calcio extracelular, pero sí del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que se libera de compartimientos intracelulares por la acción del inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ).

### **Estimulación de la síntesis de ON por la activación de los receptores de glutamato.**

El GMPc es una molécula esencial involucrada en la transducción visual en la retina. La rodopsina de los fotorreceptores se activa por estimulación luminosa y a su vez activa a una proteína G, la transducina. La activación subsecuente de la fosfodiesterasa del GMPc por la transducina reduce la concentración de GMPc, lo que ocasiona el cierre de los canales de  $\text{Na}^+$  y la hiperpolarización del receptor. Cuando hay un estímulo luminoso, disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Yau y Nakatani, 1985; Koch y Stryer, 1988), aumenta la actividad de la guanilato ciclasa en el segmento externo de los bastones en sapo y bovino (Pepe et al., 1986; Koch y Stryer, 1988) y se inhibe la actividad de la fosfodiesterasa (Kawamura y Murakami, 1991).

Los aminoácidos excitadores, kainato (KA), quisqualato y NMDA estimulan la síntesis de GMPc en la retina (Anand et al., 1985). En varias

regiones del cerebro se ha demostrado que la síntesis de GMPc inducida por aminoácidos excitadores se debe a la acción del ON y, por lo tanto, a la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (Garthwaite et al., 1989a;b; Bredt y Snyder, 1989).

Zeevalk y Nicklas (1994) encontraron que estos aminoácidos excitadores estimulan la síntesis del GMPc en la retina de pollo, lo que concuerda con los resultados previos de Anand et al. (1985). Tanto el curso temporal de la estimulación de la síntesis de GMPc por NMDA como la dependencia de la dosis de este proceso en la retina es similar en ambos trabajos, lo cual sugiere que la inducción de la síntesis de GMPc en la retina, como en otras regiones del SNC, involucra la acción del ON (Garthwaite et al., 1989a;b; Bredt y Snyder, 1989). El ON estimula a la guanilato ciclasa soluble, lo que aumenta la concentración de GMPc, en forma dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Mayer et al., 1989), de NADPH y de CaM intracelular (Stuehr et al., 1989; Palmer y Moncada, 1989; Forstermann et al., 1990). La activación de la NOS por los receptores a glutamato, se debe al incremento del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  que activa a la NOS dependiente del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM para sintetizar ON.

El papel inductor del ON en el aumento de la concentración de GMPc como consecuencia de la estimulación por aminoácidos excitadores en la retina de pollo, se basa en tres descubrimientos: primero, el incremento de GMPc inducido por aminoácidos excitadores se inhibe por la N-nitro-L-arginina (NNA), inhibidor de la NOS; la síntesis de ON por la estimulación de los receptores NMDA, así como la síntesis de GMPc se bloquea con la

hemoglobina. Segundo, de manera similar a lo encontrado en rebanadas de cerebro (Garthwaite et al., 1989a), la L-arginina por sí sola no tiene efecto, pero aumenta la síntesis de GMPc estimulada por NMDA. Y, por último, la L-arginina revierte la inhibición causada por la NNA.

La síntesis de GMPc inducida por aminoácidos excitadores se produce a través de la estimulación de receptores específicos. El bloqueo de los receptores de NMDA con MK-801 (dizocilpina) impide el aumento del GMPc estimulado por NMDA, mientras que la L-6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3 diona (CNQX), antagonista de los receptores AMPA/KA, bloquea el aumento de GMPc provocado por BOAA ( $\beta$ -oxalil-amino-L-alanina), KA y DO (ácido domoico; Zeevalk y Nicklas, 1994). El aumento de la síntesis de GMPc producido por el glutamato se inhibe parcialmente, tanto por el MK-801 como por la CNQX, lo que indica que el glutamato endógeno estimula la síntesis de GMPc a través de múltiples subtipos de receptores (Zeevalk y Nicklas, 1994).



## **OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo es cuantificar la síntesis de ON durante el desarrollo embrionario de la retina de pollo con el fin de establecer la relación entre la síntesis del ON y el desarrollo de la retina, es decir, definir la etapa del desarrollo embrionario en la que se presenta una mayor síntesis de este neurotransmisor.

Asimismo se pretende caracterizar farmacológicamente a los receptores ionotrópicos de glutamato involucrados en la inducción de la síntesis de ON en la retina de embriones de pollo.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### *Extracción e incubación del tejido de embriones de 8 y 14 días del DE y de pollos de dos días de edad.*

Se extrajeron los ojos de embriones de 8 y 14 días de desarrollo embrionario y de pollos de 2 días de edad (E8, E14 y PH2, respectivamente); se hizo un corte ecuatorial del globo ocular y se eliminó el humor vítreo y la región anterior del ojo. Las retinas se extrajeron libres de epitelio pigmentado y se colocaron en medio Krebs frío (NaCl 118 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM,  $\text{SO}_4\text{Mg}$  1.17 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, glucosa 5.6 mM).

### *Cuantificación de citrulina (medida indirecta de la síntesis de ON).*

Las retinas de E8, E14 y PH2 se incubaron por separado en 1 ml de Krebs y arginina- $[\text{H}^3]$  ( $1\mu\text{Ci}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. La reacción se paró extrayendo las retinas del medio de incubación y lavándolas en 2 ml de Hepes/EDTA (20mM y 2mM respectivamente) a pH 5.5. El tejido se homogeneizó en 2 ml de Hepes/EDTA a alta velocidad. Para obtener la fracción citosólica, el homogeneizado se centrifugó a 28,000 r.p.m. durante 20 minutos. El sobrenadante se pasó a través de una columna con resina de intercambio iónico Dowex AG 50W-X8 (forma sódica) y se eluyó con 2 ml de agua; la radiactividad del eluado se cuantificó en el espectrofotómetro de centelleo líquido empleando tritosol como líquido de centelleo.

Se realizó una cromatografía de capa fina para asegurar que la arginina- $[\text{H}^3]$  se une a la resina Dowex AG 50W-X8 (forma sódica), y que en el eluado

solamente se cuantifica la citrulina- $[H^3]$ . Se preparó una alícuota con arginina y citrulina, que pasó a través de la columna. En una placa cromatográfica con sílica gel se pusieron como control arginina y citrulina, así como también la mezcla de estos aminoácidos que previamente pasó a través de la columna. Se colocó la placa en una cámara cromatográfica utilizando como solvente butanol: etanol:ácido acético: agua (3:1:1:2); la placa se reveló con ninhidrina para observar las diferentes marcas de cada aminoácido. De la mezcla de aminoácidos que pasó a través de la columna, la marca corresponde a la citrulina. De esta forma se comprobó que a la resina únicamente se une arginina.

#### ***Efecto del NMDA sobre la síntesis de ON.***

Las retinas de E14 y de PH2, se incubaron como se describió anteriormente, pero en este caso se incluyó NMDA (1mM o 5mM) a dos tiempos: 5 y 30 minutos. Cuando el tiempo de incubación fue de 30 minutos, el NMDA se incluyó durante los 5 minutos antes de parar la reacción.

Se estudió el efecto del MK-801 sobre la síntesis de ON inducida por NMDA 5mM. Las retinas se preincubaron 10 minutos en presencia de MK-801 5 $\mu$ M, posteriormente se incluyó el NMDA 5mM y se incubaron las retinas durante 30 minutos.

#### ***Efecto de diferentes concentraciones de NMDA sobre la síntesis de ON.***

Las retinas de E14 se incubaron en 1 ml de Krebs y arginina- $[H^3]$

(1 $\mu$ Ci) a 37°C durante 30 minutos y en el minuto 25 se agregó el NMDA (50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 1mM y 5mM).

#### ***Efecto del MK-801 sobre la síntesis de ON.***

Las retinas de E14 se incubaron como en los ensayos anteriores, en el minuto 15 se agregó MK-801 5 $\mu$ M y en el minuto 25 se agregó NMDA (100 $\mu$ M y 5mM).

#### ***Efecto de diferentes concentraciones de KA sobre la síntesis de ON.***

Las retinas de E14 se incubaron en 1 ml de Krebs y arginina-[H<sup>3</sup>] (1 $\mu$ Ci) a 37°C durante 30 minutos. El KA (50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 1mM y 5mM) se agregó en el minuto 25.

#### **Estadística**

Las gráficas y el análisis de datos se hicieron con el programa Prism 2.0 (GraphPad Software, Inc.).

#### **Reactivos**

Todos los reactivos para preparar las soluciones, el medio Krebs y la resina Dowex AG 50W-X8 se obtuvieron de Sigma. Los agonistas NMDA y KA, y el antagonista MK-801 se obtuvieron de Tocris Cookson (Bristol, Engl.). La arginina-[H<sup>3</sup>] (actividad específica de 44.2 y 38.5 Ci/mmol) se obtuvo de NEN (Boston, MA).

## RESULTADOS.

### 1. Síntesis de ON en condiciones basales.

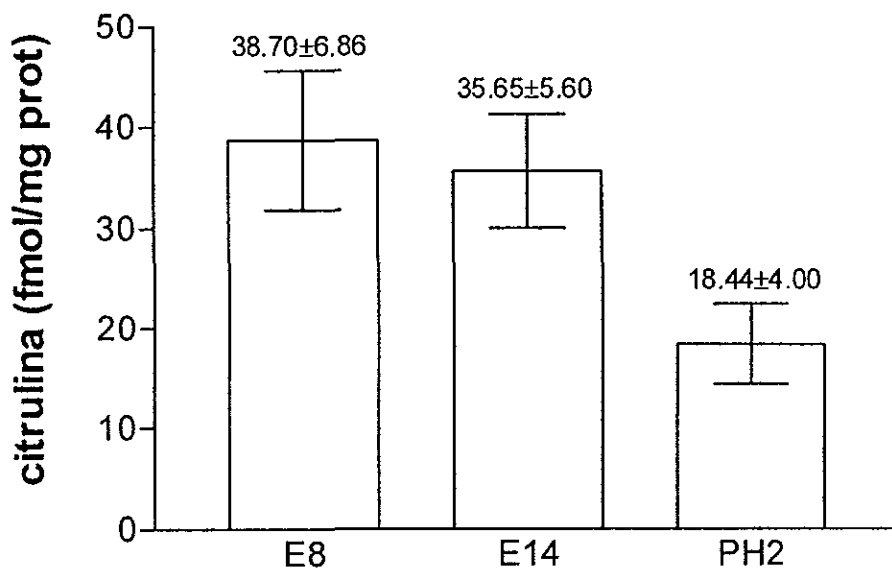
Estos experimentos se realizaron con el fin de cuantificar la síntesis de óxido nítrico durante el desarrollo embrionario de la retina de pollo. La síntesis de ON se determinó midiendo la concentración de citrulina-[ $H^3$ ] derivada de la arginina-[ $H^3$ ] por la reacción: arginina  $\rightarrow$  citrulina + ON. Como se observa en la gráfica 1, la síntesis de ON es mayor en etapas tempranas del desarrollo embrionario, y disminuye después de la eclosión. La síntesis de ON en la retina de embriones de 8 (E8) y de 14 días (E14) se mantiene constante, y disminuye significativamente en la retina de pollos de 2 días de edad (PH2).

### 2. Efecto del NMDA sobre la síntesis de ON.

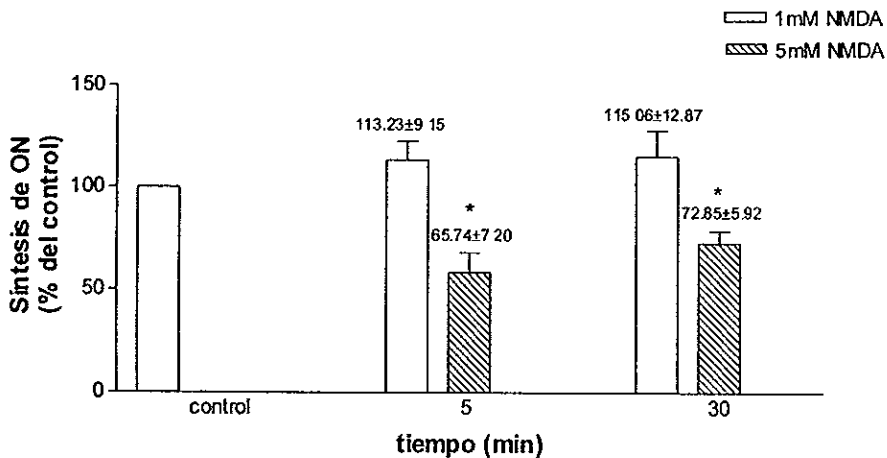
#### *A. Retina de embriones de 14 días de desarrollo.*

Para determinar el efecto del NMDA sobre la síntesis de ON, se incubó a las retinas 5 y 30 minutos en presencia de NMDA 1mM. No se observó cambio respecto al control (Gráfica 2). A una concentración de 5mM el NMDA, en las mismas condiciones, inhibió aproximadamente 30% la síntesis de ON. Se estudió el efecto del MK-801 (dizocilpina), un antagonista no competitivo de los receptores de tipo NMDA, sobre la inhibición de la síntesis de ON inducida por NMDA (Gráfica 3). Las retinas se preincubaron en presencia de MK-801 5 $\mu$ M por 10 minutos, seguida de una incubación por 30 minutos, después de la inclusión de NMDA 5mM. El MK-801 bloqueó el efecto inhibitor del NMDA.

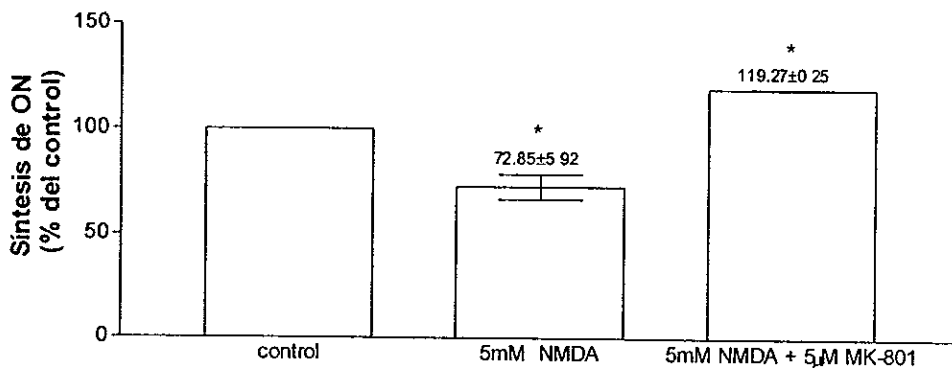
## Síntesis de ON



**Gráfica 1.** Síntesis de ON en la retina de pollo en diferentes etapas del desarrollo embrionario. E8, embriones de 8 días; E14, embriones de 14 días; PH2, pollos de 2 días de edad. Los resultados son el promedio  $\pm$  ES de 6-11 experimentos.  $P < 0.05$ , t de Student.



**Gráfica 2.** Efecto del NMDA 1mM y 5mM sobre la síntesis de ON en embriones de 14 días. El control en ausencia de NMDA (100%); las retinas se incubaron 5 y 30 minutos en presencia de NMDA 1mM y 5mM. Los resultados se expresan como el porcentaje de síntesis de ON respecto al control. Los datos son el promedio  $\pm$  ES de 4-5 experimentos.  $P < 0.05$ , t de Student, (\*) diferencia significativa.



**Gráfica 3.** Efecto del NMDA y el MK-801 sobre la síntesis de ON en retina de embriones de 14 días. Control en ausencia de NMDA (100%); las retinas se incubaron 30 minutos en presencia de NMDA (1mM y 5mM); el MK-801 se incluyó 10 minutos antes de agregar el NMDA. Los resultados se expresan en porcentaje de síntesis de ON respecto al control. Se presenta el promedio  $\pm$  ES de 3-5 experimentos.  $P < 0.05$ , t de Student, (\*) diferencia significativa.



### ***B. Retina de pollos de 2 días de edad.***

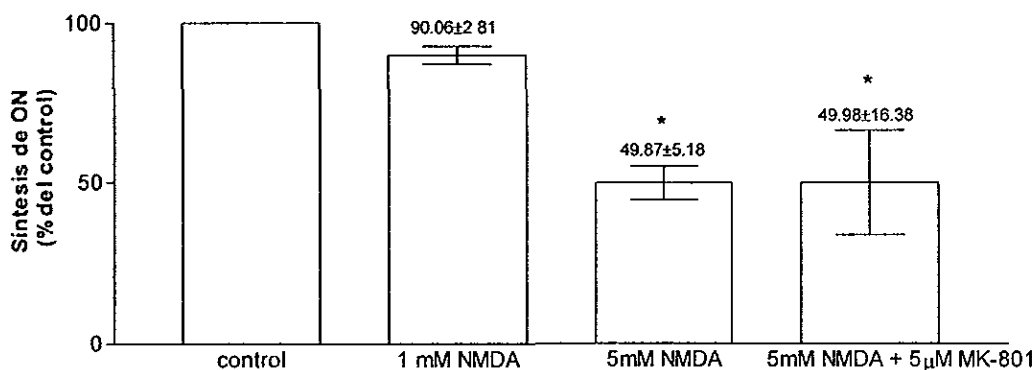
Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de NMDA (1mM y 5mM) sobre la síntesis de ON en la retina de pollos de 2 días de edad. El NMDA 5mM inhibió la síntesis de ON, respecto al control, mientras que a la concentración de 1mM, no tuvo efecto (Gráfica 4). El MK-801, antagonista no competitivo del NMDA, no afecta la inhibición por NMDA 5mM en la retina de pollos de 2 días de edad (Gráfica 4), a diferencia del efecto observado en las retinas de embriones de 14 días de desarrollo embrionario (Gráfica 3), en las que el antagonista del receptor revierte la inhibición inducida por NMDA.

### ***C. Efecto de diferentes concentraciones de NMDA sobre la síntesis de ON.***

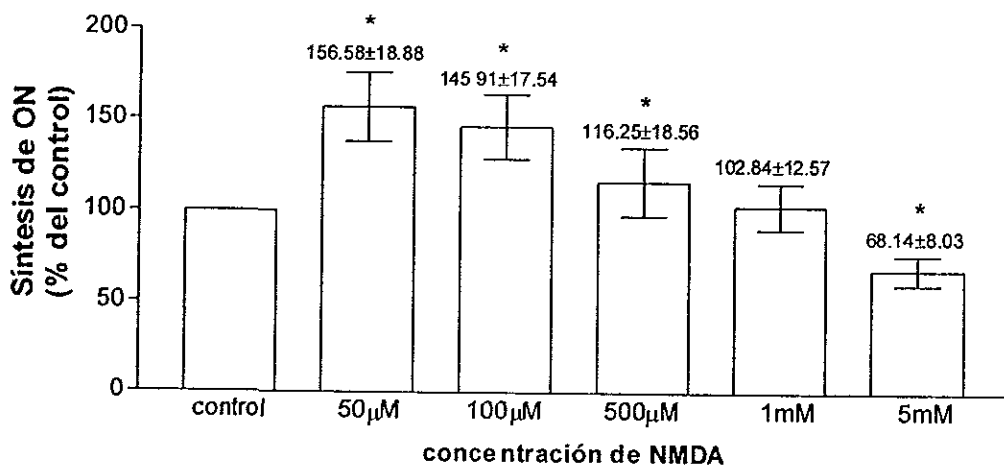
Se probó el efecto de diferentes concentraciones de NMDA sobre la síntesis de ON: 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 1mM y 5mM. Las retinas de embriones de 14 días de desarrollo embrionario, se incubaron en presencia de la droga por 5 minutos. A concentraciones de 50 $\mu$ M y 100 $\mu$ M, el NMDA estimuló la síntesis de ON 56% y 45%, respectivamente, sobre el control. Mientras que 500 $\mu$ M de NMDA sólo induce una estimulación del 16% sobre el control. El NMDA 1mM no modificó la concentración basal de ON, mientras que a 5mM, el compuesto inhibió 32% la síntesis del ON respecto a la condición normal (Gráfica 5).

### **3. Efecto del MK-801 sobre la síntesis de ON.**

Para explorar la participación de los receptores de glutamato del tipo



Gráfica 4. Efecto del NMDA (5mM) y el MK-801 (5µM) sobre la síntesis de ON en la retina de pollos de 2 días de edad. Las retinas se incubaron 30 minutos en presencia de NMDA (5mM); el antagonista MK-801 se agregó 10 minutos antes que el NMDA. Los resultados se expresan en porcentaje de síntesis de ON respecto al control en ausencia de las drogas (100%). Se presenta el promedio ± ES de 4-5 experimentos.  $P < 0.05$ , t de Student, (\*) diferencia significativa.



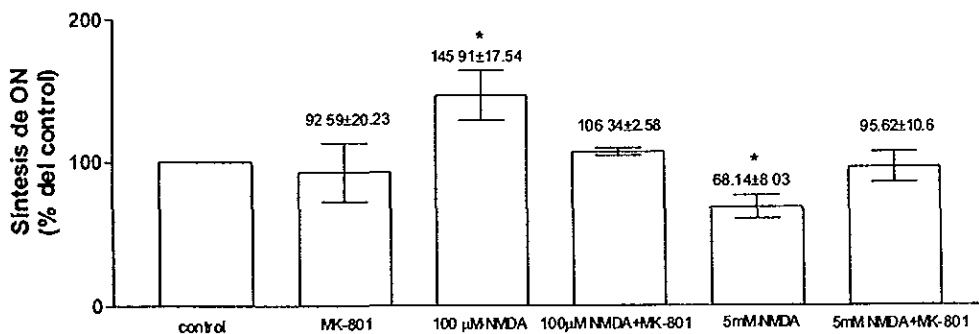
Gráfica 5. Efecto de concentraciones crecientes de NMDA sobre la síntesis de ON en retinas de embriones de 14 días del desarrollo embrionario. Las retinas se incubaron en presencia de NMDA 50µM, 100µM, 500µM, 1mM y 5mM durante 5 minutos. Los resultados se expresan en porcentaje de síntesis de ON respecto al control en ausencia de la droga (100%). Los datos son el promedio ± ES de 4-7 experimentos.  $P < 0.05$ , t de Student, (\*) diferencia significativa.

NMDA, en la regulación del nivel basal de ON, se inhibió la activación de los mismos con el antagonista MK-801 (Gráfica 6); el compuesto no modificó la concentración de ON respecto al control, lo que indica que el glutamato no participa en el mantenimiento de la concentración basal de ON a través de los receptores NMDA.

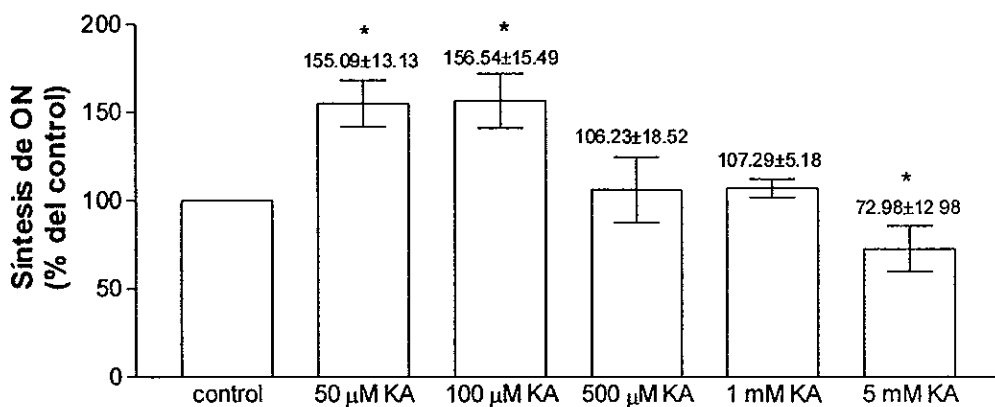
Por otra parte, el MK-801 inhibió tanto la estimulación producida por NMDA 100 $\mu$ M como la inhibición observada en presencia de NMDA 5mM.

#### **4. Efecto del KA sobre la síntesis de ON.**

Con el fin de determinar la participación de otros tipos de receptores de glutamato en la regulación de la síntesis de ON, se probó el efecto del KA que es un agonista del glutamato para los receptores de tipo AMPA/KA. Se incubó a las retinas por 5 minutos (Gráfica 7) con concentraciones de 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 1mM y 5mM de KA. El efecto del KA sobre la síntesis de ON, fue similar al efecto del NMDA; es decir, concentraciones de 50 $\mu$ M y 100 $\mu$ M estimularon la síntesis de ON, 55% y 56% respectivamente, sobre el control. 500 $\mu$ M y 1mM de KA no tuvieron efecto, y 5mM inhibió 30% la síntesis de ON (Gráfica 7).



Gráfica 6. Efecto de MK-801 (5μM) sobre la síntesis de ON en retina de embriones de 14 días, en presencia de NMDA (100μM y 5mM). Control en ausencia de droga (100%); las retinas se preincubaron 10 minutos en presencia de MK-801 5μM y a continuación se incubaron 5 minutos en presencia de NMDA (100μM ó 5mM). Los resultados se expresan en porcentaje de síntesis de ON respecto al control (100%) en ausencia de la droga. Las cifras corresponden al promedio ± ES de 4-7 experimentos. P<0.05, t de Student, (\*) diferencia significativa.



**Gráfica 7.** Efecto del KA sobre la síntesis de ON en la retina de embriones de 14 días. Control en ausencia de KA (100%). Las retinas se incubaron 5 minutos en presencia de KA 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 1mM y 5mM. Los resultados se expresan en porcentaje de la síntesis de ON respecto al control en ausencia del agonista (100%). Los datos son el promedio  $\pm$  ES de 3-4 experimentos.  $P < 0.05$ ,  $t$  de Student, (\*) diferencia significativa.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El desarrollo de la retina de pollo se divide en tres etapas: la primera (primeros 6 días de desarrollo embrionario) se distingue por una proliferación celular activa; en la segunda etapa, del día 7 al 12, la síntesis de DNA y eventos mitóticos declinan progresivamente, mientras que incrementa el volumen y peso del tejido; en retinas de 7 días la estratificación celular característica de este tejido aún no ha comenzado. Los eventos de diferenciación empiezan durante esta segunda etapa y continúan durante la tercera etapa, hasta la eclosión (Tesoriere et al., 1995).

Goureau y colaboradores (1997) demostraron que en alícuotas de retina de pollo (contenido de proteínas conocido en donde previamente se eliminó la arginina endógena), la menor actividad de la sintasa del óxido nítrico (NOS), tanto en citosol como en extractos membranales, se observa en etapas tempranas del desarrollo embrionario (DE), incrementándose en los días 12 y 14, y una mayor actividad en el día 18 DE y 8 días después de la eclosión. Ientile y colaboradores (1996), por el contrario, demostraron que en fragmentos de retina y en preparaciones citosólicas, la actividad de la NOS es mayor en etapas tempranas del DE, y esta actividad disminuye a partir del día 13 DE hasta la eclosión.

En este trabajo, empleando la retina completa de embriones de 8 y 14 días DE (E8 y E14) y de pollos de 2 días de nacidos (PH2), se observó que, al igual que Ientile y colaboradores, la mayor síntesis de ON es en etapas tempranas del DE, y disminuye después de la eclosión (Gráfica 1).

La variación de la actividad de la NOS durante el desarrollo de la retina parece ser un indicador que pone en evidencia la participación del ON en procesos de proliferación celular, en el incremento en peso y volumen del tejido, así como en la diferenciación celular. El hecho de que en las primeras etapas del DE (E8) la síntesis de ON sea mayor en la retina y en el cerebro, antes de la sinaptogénesis, sugiere que el ON participa en el desarrollo de células neuronales y no neuronales. La mayor concentración de receptores a AMPA se presenta al día 7 DE, declinando su concentración en los días subsiguientes. La unión específica de L-glutamato-[ $H^3$ ] y de NMDA-[ $H^3$ ] a los receptores es baja hasta el día 11 DE, a partir del cual, aumenta la densidad de los mismos hasta alcanzar un máximo al día 18 DE (Somohano et al., 1988). De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede decir que los receptores AMPA están involucrados en la síntesis de ON en la primera etapa del DE (8 días), y los receptores NMDA en la segunda etapa del DE (14-18 días).

En la retina de pollo, al igual que en el cerebelo y en el hipocampo (Garthwaite, 1991; Garthwaite et al., 1988), la síntesis de ON se estimula con NMDA (50 $\mu$ M y 100 $\mu$ M, Gráfica 5). El efecto del NMDA se debe a la estimulación de los receptores ionotrópicos de glutamato del tipo NMDA. Estos receptores provocan un incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  que activa a la NOS que depende del complejo  $Ca^{2+}$ /CaM para sintetizar ON.

Cuando se empleó NMDA 5mM se observó una inhibición en la síntesis de ON (Gráfica 5). A este respecto, cabe mencionar que cualquier estímulo



que incremente los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca la activación de la CaM, cofactor de las isoformas constitutivas de la NOS (NOS<sub>n</sub> y NOS<sub>e</sub>; Nakane et al., 1991; Bredt et al., 1992). La CaM también puede activar a la cinasa II dependiente de CaM (CaMKII) que fosforila a la NOS teniendo como resultado una rápida reducción en la actividad de la enzima (Nakane et al., 1991; Bredt et al., 1992); esta fosforilación también se observa cuando entra  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula por medio del ionóforo A23187 (Bredt et al., 1992; Dinerman et al., 1994). La CaM también activa a la calcineurina que desfosforila a la NOS para incrementar su actividad catalítica (Steiner et al., 1992; Dawson et al., 1993). La proteína cinasa C (PKC) también puede fosforilar a la NOS para disminuir su actividad (Bredt et al., 1992), por lo que, dependiendo de la concentración de NMDA, puede observarse una activación o una inhibición de la actividad de la NOS.

Asimismo la activación de la NOS genera ON, que activa a la guanilato ciclasa soluble y por lo tanto se elevan los niveles intracelulares de GMPc (Garthwaite, 1991; Garthwaite et al., 1988). Este incremento de GMPc estimula a la cinasa dependiente de GMPc provocando la fosforilación de la NOS y un decremento en la actividad de ésta (Nakane et al., 1991; Bredt et al., 1992). Un nivel adicional de complejidad en la regulación de la NOS, es que la enzima está sujeta a la inhibición por su producto final, el ON, probablemente a través de la interacción del ON con el hierro del cofactor hemo de la enzima (Griffith y Stuehr, 1995). A la fecha, no se sabe si este mecanismo de regulación juega un papel importante *in vivo*. (Hu y El-Fakahany, 1996).

La activación de la NOS a través de los receptores de tipo NMDA puede activar dos mecanismos: (1) un incremento en los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  y (2) la activación de la PKC (Marin et al., 1992). A este respecto, se sabe que en la estimulación de los receptores de glutamato, la activación de la PKC puede ser más duradera que el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Martinson et al., 1990; Nishizuka, 1992).

El efecto del NMDA sobre los receptores ionotrópicos del tipo NMDA es específico, ya que en la retina de E14, el MK-801 (bloqueador de canal abierto de este tipo de receptores) revierte tanto la estimulación como la inhibición causada por el NMDA (Gráfica 3). En la retina de PH2, el MK-801 no revierte la inhibición del NMDA 5mM (Gráfica 4), posiblemente porque en la etapa adulta los receptores de tipo NMDA tienen baja afinidad por este antagonista no competitivo (Boje et al., 1992), lo que sugiere un cambio en la composición heteromérica de los receptores durante el desarrollo de la retina.

Es probable que el NMDA no tenga efecto excitotóxico en la retina, ya que no hay diferencias de la síntesis de ON, con respecto al tiempo de exposición del tejido a la droga (Gráfica 2).

Al estimular con KA (50 $\mu\text{M}$  y 100 $\mu\text{M}$ ), agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato del tipo AMPA/KA, la síntesis del ON aumentó con respecto a la síntesis en condiciones basales (Gráfica 7). A este respecto, se sabe que al estimular estos receptores se produce un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, lo que provoca la activación de la CaM por la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, aumentando la actividad de la NOS constitutiva (Zeevalk y Nicklas, 1994; Mayer et al., 1989; Forstermann et al., 1990).

Los canales de los receptores a NMDA y de los AMPA/KA difieren entre sí, en que los de NMDA, y no así los de AMPA/KA, están bloqueados por  $Mg^{2+}$  en condiciones fisiológicas, por lo que se requiere de una despolarización previa para su activación. Por lo anterior, Allcorn y colaboradores (1996) han propuesto que en etapas tempranas del desarrollo, los receptores de AMPA/KA son la principal vía de entrada del  $Ca^{2+}$  a las neuronas. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis ya que indican que en esta etapa temprana del DE de la retina hay un aumento en la síntesis de ON provocada por el KA  $50\mu M$  y  $100\mu M$  (Gráfica 7).

Como el glutamato y otros aminoácidos excitadores, el KA actúa como una neurotoxina muy potente pero selectiva cuando se aplica en ojos de vertebrados tanto en etapas embrionarias como en adultos (Goto et al., 1981; Hampton et al., 1981; Ingham y Morgan, 1983; Morgan y Ingham, 1981; Shwarcz y Coyle, 1977; Yazulla y Kleinschmidt, 1980). Las retinas expuestas al KA durante un período largo de tiempo o bien a altas concentraciones de KA, sufren un daño en las neuronas de la capa nuclear interna así como en la capa de células ganglionares; además, se observan grandes vacuolas en las capas plexiformes interna y externa (Ingham y Morgan, 1983; Morgan y Ingham, 1981). La inhibición de la síntesis de ON inducida por  $5mM$  de KA podría deberse a un efecto excitotóxico del mismo (Gráfica 7), ya que en esta etapa del DE (entre 8 y 15 días) se incrementa la sensibilidad de la retina al KA, debido a un aumento en la concentración y eficiencia de los sitios de unión para el KA así como a una distribución más amplia de los mismos (Gibson y Reif-Lehrer, 1984).

Los resultados de este trabajo apoyan la idea de que el ON participa en el DE de la retina de pollo. Posiblemente este neurotransmisor está involucrado en procesos de proliferación y diferenciación celular, ya que en esta etapa del DE (8-14 días) la síntesis de ON es mayor (Gráfica 1).

Por otro lado, en este trabajo también se demostró que la síntesis de ON se estimula por la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato del tipo NMDA y KA. Posiblemente esto se deba a que al activar estos receptores hay un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que activa a la NOS dependiente del complejo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ .

La retina es un excelente modelo para estudiar los cambios en la síntesis de ON, tanto la basal como la inducida por NMDA y KA, durante el desarrollo de este tejido, para de esta manera elucidar el papel del ON en el desarrollo neuronal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad, I., Leinders-Zufall, T., Kocsis, J.D., Shepherd, G.M., Zufall, F. & Barnstable, C.J. (1994). Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors. *Neuron*, 12:155-165.
2. Allcorn, S., Catsicas, M. & Mobbs, P. (1996). Developmental expression and self-regulation of Ca<sup>2+</sup> entry via AMPA/KA receptors in the embryonic chick retina. *Eur. J. Neurosci.*, 8:2499-2510.
3. Anand, H., Roberts, P.J. & López-Colomé, A. (1985). Excitatory amino acids in the chick retina: possible involvement of cyclic guanosine monophosphate. *Neurosci. Lett.*, 58:31-36.
4. Ascher, P. & Nowak, L. (1988). The role of divalent cations in the *N*-methyl-D-aspartate response of mouse central neurones in culture. *J. Physiol. (Lond.)*, 399:247-266.
5. Bliss, T.V.P. & Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory—long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361:31-39.
6. Boje, K.M., Skolnick, P., Raber, J., Fletcher, R.T. & Chader, G. (1992). Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. *Neurochem. Int.*, 20:473-486.
7. Brecht, D.S., Ferris, C.D., & Snyder, S.H. (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites: Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase C, and calcium-calmodulin binding sites. *J. Biol. Chem.* 267:10976-10981.
8. Brecht, D.S., Hwang, P.M. & Snyder, S.H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347:768-770.
9. Brecht, D.S. & Snyder, S.H. (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:9030-9033.
10. Brecht, D. S. & Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 682-685.

11. Brecht, D. S. & Snyder, S.H. (1994a). Nitric oxide: A Physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:175-195.
12. Brorson, J.R., Manzillo, P.A. & Miller, R.J. (1994).  $Ca^{2+}$  entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.*, 14:187-197.
13. Burnashev, N., Khodorova, A., Jonas, P., Helm, P.J., Wisden, W., Monyer, H., Seeburg, P.H. & Sakmann, B. (1992a). Calcium-permeable AMPA/KA receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science*, 256:1566-1570.
14. Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P.H. & Sakmann, B. (1992b). Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron*, 8:189-198.
15. Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E. & Sakmann, B. (1995). Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptors subtypes. *J. Physiol.*, 485:403-418.
16. Catsicas, S. & Clarke, P.G.H. (1987). Spatiotemporal gradients of KA sensitivity in the developing chick retina. *J. Comp. Neurol.*, 262:512-522.
17. Collingridge, G.L., & Singer, W. (1990). Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 290-296.
18. Crepel, F. & Jaillard, D. (1990). Protein kinases, nitric oxide and long-term depression of synapses in the cerebellum. *NeuroReport*, 1:133-136.
19. Davenport, R.W., Bolsover, S.R. & Kater, S.B. (1994). Development of axons: calcium, steering and the growth cone. En Waxman, S.G. Kocsis, J.D. & Stys, P.K. (eds), *The Axon: Structure, Function and Pathophysiology*. Oxford University Press, Oxford, pp. 200-217.
20. Dawson, D. A. (1994). Nitric oxide and focal cerebral ischemia: Multiplicity of actions and diverse outcomes. *Cerebrovasc., Brain Metabol. Rev.*, 6, 299-324.
21. Dawson, T.M., Brecht, D.S., Fotuhi, M., Hwang, P.M. & Snyder, S.H. (1991a). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:7797-7801.
22. Dawson, T.M., & Snyder, S.H. (1994). Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.*, 14:5147-5159.

23. Dawson, T. M. & Snyder, S. H. (1994). Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.*, *14*, 5147-5159.
24. Dawson, T.M., Steiner, J.P., Dawson, V.L., Dinerman, J.L., Uhl, G.R. & Snyder, S.H. (1993). Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *90*:9808-9812.
25. Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Brecht, D.S. & Snyder, S. (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *88*:6368-6371.
26. DeVries, S. H., & Schwartz, E. A. (1989). Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers. *J. Physiol. Lond.*, *414*:351-375.
27. Dinerman, J.L., Steiner, J.P., Dawson, T.M., Dawson, V. & Snyder, S.H. (1994). Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacol.*, *33*:1245-1251.
28. Ehrlich, D. & Morgan I.G. (1980). Kainic acid destroys displaced amacrine cells in post-hatch chicken retina. *Neurosci. Lett.*, *17*:43-48.
29. Faraci, F. M. & Brian, J. E. (1994). Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke*, *25*, 692-703.
30. Fostermann, U., Gorsky, L.D. & Pollock, J.S. (1990). Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like materials in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol. Pharmacol.*, *38*:7-13.
31. Gally, J.A., Montague, P. R., Reeke, G. N., Jr., & Edelman, G. M. (1990). The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in development and function of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *87*: 3547-3551.
32. Garthwaite, J. (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.*, *14*:60-67.
33. Garthwaite, J. (1995): Neural nitric oxide signalling. *Trends Neurosci.*, *18*:51-52.
34. Garthwaite, J., Charles, S. L., & Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA

- receptors suggest role as intracellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388.
35. Garthwaite, J. & Garthwaite, G. (1987). Cellular origins of cyclic GMP responses to excitatory amino acid receptor agonist in rat cerebellum in vitro. *J. Neurochem.*, 48:29-39.
  36. Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M.J. & Moncada, S. (1989a). NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.*, 172:413-416.
  37. Garthwaite, J., Southam, E. & Anderton, M. (1989b). A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J. Neurochem.*, 53:1952-1954.
  38. Gibson, B.L. & Reif-Lehrer, L. (1984). In Vitro effects of kainate on embryonic and posthatching chick retina. *Dev. Brain Res.*, 15:97-103.
  39. Gilbertson, T.A., Scobey, R. & Wilson, M. (1991). Permeation of calcium through non-NMDA glutamate channels in retinal bipolar cells. *Science*, 251:1613-1615.
  40. Goldstein, I. M., Ostwald, P. & Roth, S. (1996). Nitric Oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res.*, 36:2979-2994.
  41. Goto, M., Inomata, N., Ono, H., Saito, K. Fukada, H. (1981). Changes of electroretinogram and neurochemical aspects of gabaergic neurons of retina after intraocular injection of kainic acid in rats. *Brain Res.*, 211:305-311.
  42. Goureau, O., Régnier-Ricard, F., Jonet, L., Jeanny, J.C., Courtois, Y. & Chany-Fournier, F. (1997). Developmental expression of nitric oxide synthase isoform I and III in chick retina. *J. Neurosci. Res.*, 50:104-113.
  43. Griffith, O.W. & Stuehr, D.J. (1995). Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.*, 57:737-769.
  44. Hampton, C. Garcia, C. & Redburn, D. (1981). Localization of kainic acid-sensitive cells in mammalian retina. *J. Neurosci. Res.*, 6:99-111.
  45. Hartly, D.M., Kurth, M.C., Bjerckness, L., Weiss, J.H. & Choi, D.W. (1993). Glutamate receptor-induced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J. Neurosci.*, 13:1993-2000.
  46. Hollmann, M., Hartley, M. & Heinemann, S. (1991).  $\text{Ca}^{2+}$ -permeability of KA-AMPA gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*, 252:851-853.



47. Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K. M. & Vincent, S.R. (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:2811-2814.
48. Hu, J. & Van Eldik, L. (1998). Regulation of nitric oxide synthase by calmodulin. *En "Calmodulin and Signal Transduction"* (L. Van Eldik & D.M. Watterson, ed.), pp 288-334. Academic Press.
49. Huang, P.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S.H., & Fishman, M.C. (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75:1273-1286.
50. Iino, M., Ozawa, S. & Tsuzuki, K. (1990). Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.*, 424:151-165.
51. Ingham, C.A & Morgan, I.G. (1983). Dose-dependent effects of intravitreal kainic-acid on specific cell types in chicken retina. *Neurosci.*, 9:165-181.
52. Insel, T.R., Miller, L.P. & Gelhard, L.E. (1990). The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain—I. N-Methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neurosci.*, 35:31-43.
53. Ito, M., & Karachot, L. (1990). Messengers mediating long-term desensitization in cerebellar Purkinje cells. *NeuroReport* 1:129-132.
54. Izumi, Y., Benz, A.M., Clifford, D.B. & Zorumski, C.F. (1992). Nitric oxide inhibitors attenuate N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.*, 135:227-230.
55. Kawamura, S. & Murakami, M. (1991). Calcium-dependent regulation of cyclic GMP phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods. *Nature*, 349:420-422.
56. Kennedy, M.B. (1989). Regulation of synaptic transmission in the central nervous system: long-term potentiation. *Cell* 59: 777-787.
57. Kiechle, F. L. & Malinski, T. (1993). Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Amer. J. Clinical Pathology*, 100:567-575.
58. Knowles, R.G. & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.*, 298:249-258.
59. Koch, K.W. & Stryer, L. (1988). Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. *Nature*, 334:64-66.

60. Koch, K.-W., Lambrecht, H.-G., Haberecht, M., Redburn, D. & Schmidt, H.H.H.W. (1994). Functional coupling of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent nitric oxide synthase and a soluble guanylyl cyclase in vertebrate photoreceptor cells. *EMBO J*, 13:3312-3320.
61. Komuro, H. & Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260:95-97.
62. Kuo, P. C. & Schroeder, R. A. (1995). The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Annals Surgery*, 221, 220-235.
63. Kurenyy, D. E., Moroz, L. L., Turner, R. W., Sharkey, K. A. & Barnes, S. (1994). Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide. *Neuron*, 13:315-324.
64. Lau, K. C., So, K.-F., Tay, D. & Leung, M. C. P., (1994). NADPH-diaphorase neurons in the retina of the hamster. *J. Comp., Neurol.*, 350:550-558.
65. Lauder, J.M. (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and seconds messengers. *Trends Neurosci.*, 16:233-240.
66. Liepe, B. A., Stone, C., Koistinaho, J. & Copenhagen, D. R. (1994). Nitric oxide synthase in Müller cells and neurons of salamander and fish retina. *J. Neurosci.*, 14:7641-7654.
67. Lipton, S.A. & Kater, S.B. (1989). Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trend Neurosci.*, 12:265-270.
68. MacDermott, A.B., Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Smith, S.L. & Barker, J.L. (1986). NMDA receptor activation increase cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 321:519-522.
69. Manzoni, O., Prezeau, L., Martin, P., Deshager, S., Bockaert, J. & Fagni, L. (1992). Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron*, 8:653-662.
70. Marin, P., Lafon-Cazal, M. & Bockaert, J. (1992). A nitric oxide synthase activity selectively stimulated by NMDA receptors depends on protein kinase C activation in mouse striatal neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 4:425-432.
71. Marletta, M.A. (1994). Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78:927-930.
72. Martin, W. & Gillespie, J.S. (1990). En *Novel peripheral neurotransmitters* (Bell, C., ed.), pp. 65-79. Pergamon.

73. Martinson, E.A., Trilivas, I. & Brown, J.H. (1990). Rapid protein kinase C-dependent activation of phospholipid D leads to delayed 1,2-diglyceride accumulation. *J. Biol. Chem.*, 265:22282-22287.
74. Mayer, B. Schmidt, K., Humbert, P. & Bohme, E. (1989). Biosynthesis of endothelium derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells calcium dependently converts L-arginine into an activator on soluble guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164:678-685.
75. Mayer, M.L., Westbrook, G.L. & Guthrie, P.B. (1984). Voltage-dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309:261-263.
76. Mayer, M.L. & Westbrook, G.L. (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol.*, 394:501-527.
77. McDonald, J.W., Silverstein, F.S. & Johnston, M.V. (1988). Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.*, 459:200-203.
78. McMahon, D.G. (1994). Modulation of zebrafish horizontal cell electrical synapses by nitroprusside and cGMP (Abstract). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35:S1821.
79. Miller, L.P., Johnson, A.E., Gelhard, R.E. & Insel, T.R. (1990). The ontogeny of excitatory amino acids in the rat forebrain—II. Kainic acid receptors. *Neurosci.*, 35:45-51.
80. Miyachi, E., Miyakawa, A. & Murakami, M. (1991). Modulation of electrical coupling between retinal horizontal cells by intracellular messengers. *Neurosci. Res.*, 15:S41-S49.
81. Miyachi, E., Murakami, M. & Nakaki, T. (1990). Arginine blocks gap junctions between retinal horizontal cells. *NeuroReport*, 1:107-110.
82. Moncada, S & Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England J. Medicine*, 329:2002-2012.
83. Morgan, I.G. & Ingham, C.A. (1981). Kainic acid affects both plexiform layers of chicken retina. *Neurosci. Lett.*, 21:275-280.
84. Morris, S.M. & Billiard, T.R. (1994). New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Amer. J. Physiol.*, 266:E829-E839.
85. Murphy, S.N. & Miller, R. J. (1989). Regulation of  $Ca^{2+}$  influx into striatal neurons by kainic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 249:184-193.

86. Nakane, M., Mitchell, J., Föstermann, U. & Murad, F. (1991). Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:1396-1402.
87. Nathan, C & Xie, Q.-W. (1994a). Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell*, 78:915-918.
88. Nathan, C & Xie, Q.-W. (1994b). Regulations of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 269:13725-13728.
89. Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258:607-614.
90. Noll, G.N., Billek, M., Pietruck, C. & Schmidt, K.F. (1994). Inhibition of nitric oxide synthase alters light responses and dark voltage of amphibian photoreceptors. *Neuropharmacol.*, 33:1407-1412.
91. Okada, D. (1992). Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor mediated nitric oxide synthesis. *J. Neurochem.*, 59:1203-1210.
92. Olney, J.W. (1982). The toxic effects of glutamate and related compounds in the retina and the brain. *Retina*, 2:341-359.
93. Olney, J.W., Price, M.T., Samson, L. & Labruyere, J. (1986). The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.*, 65:65-71.
- Okada, D. (1992). Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor mediated nitric oxide synthesis. *J. Neurochem.*, 59:1203-1210.
94. Ostholm, T., Holmqvist, B.I., Alm, P. & Ekstrom, P. (1994). Nitric oxide synthase in the CNS of the atlantic salmon. *Neurosci. Lett.*, 168:233-237.
95. Paes de Carvalho, R., de Faria, M.H., do Nascimento, J.L.M. & Hokoc, J.N. (1996). Development of NADPH-diaphorase in the avian retina: regulation by calcium ion and relation to nitric oxide synthase. *J. Neurochem.*, 67:1063-1071
96. Palmer, E., Monaghan, D.T., & Cotman, C.W. (1989). Trans-ACPD, a selective agonist of the phosphoinositide-coupled excitatory amino acid receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 166:585-587.
97. Palmer, R.M.J. & Moncada, S (1989). A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 158:348-352.

98. Park, C.-S., Pardhasaradhi, K., Gianotti, C., Villegas, E. & Krishna, G. (1994). Human retina express both constitutive and inducible isoforms of nitric oxide synthase mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205:85-91.
99. Pauwels, P.J. & Leysen, J.E. (1992). Blockade of nitric oxide formation does not prevent glutamate-induced neurotoxicity in neuronal culture from rat hippocampus. *Neurosci. Lett.*, 143:27-30.
100. Pearce, I.A., Cambray-Deakin, M.A. & Burgoyne, R. D. (1987). Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett.*, 223:143-147.
101. Pellegrini-Giampietro, D.E., Bennett, M.V.L. & Zukin, R.S. (1992). Are Ca<sup>2+</sup>-permeable KA/AMPA receptors more abundant in immature brain? *Neurosci. Lett.*, 144:65-69.
102. Provis, J.M. & Mitrofanis, J. (1990). NADPH-diaphorase neurons of human retinal have a uniform topographical distribution. *Vis. Neurosci.*, 4:619-623.
103. Pruss, R.M., Akeson, R.L., Racke, M.M. & Wilburn, J.K. (1991). Agonist-activated cobalt uptake identifies divalent cation-permeable KA receptors on neurons and glial cells. *Neuron*, 7:509-518.
104. Rashid, N.A. & Cambray-Deakin, M.A. (1992). N-methyl-D-aspartate effects on the growth, morphology and cytoskeleton of individual neurons *in vitro*. *Dev. Brain. Res.*, 67:301-308.
105. Rengasamy, A. & Johns, R. (1993). Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Molec. Pharmacol.*, 44:124-128.
106. Sagar, S.M (1986). NADPH diaphorase histochemistry in the rabbit retina. *Brain Res.*, 373:153-158.
107. Sandell, J.H. (1985). NADPH diaphorase cells in the mammalian inner retina. *J.Comp. Neurol.*, 238:466-472.
108. Schmidt, H.H.H.W. & Walter, U. (1994). NO at work. *Cell*, 78:919-925.
109. Schwarcz, R. & Coyle, J.T. (1977). Kainic acid: neurotoxic effects after intraocular injections. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 16:141-148.
110. Shibuki, K., & Okada, D. (1991). Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349:326-328.

111. Shiells, R. & Falk, G. (1992). Retinal on-bipolar cells contain a nitric oxide-sensitive guanylate cyclase. *NeuroReport*, 3:845-848.
112. Snyder, S. H. & Brecht, D. S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci. Amer.*, 266, 68-77.
113. Southam, E., East, S.J. & Garthwaite, J. (1991). Excitatory amino acid receptors coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. *J. Neurochem.*, 56:2072-2081.
114. Steiner, J.P., Dawson, T.M., Fotuhi, M., Glatt, C.E., Snowman, A.M., Cohen, N. & Snyder, S.H. (1992). High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature (London)* 358:584-587.
115. Stewart, A. G., Phan, L. H. & Grigoriadis, G. (1994). Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide. *Microsurgery*, 15,693-702.
116. Venturini, C. M., Knowles, R. G., Palmer, R.M. J. & Moncada, S. (1991). Synthesis of nitric oxide in the bovine retina. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 180:920-925.
117. Vincent, S. R. & Hope, B. T. (1992). Neurons that say NO. *Trends in Neurosci.*, 15:108-113.
118. Weiler, R. & Kewitz, B. (1993). The marker for nitric oxide synthase, NADPH-diaphorase, co-localizes with GABA in horizontal cells and cells of the inner retina in the carp retina. *Neurosci. Lett.*, 158:151-154.
119. Williams, C.V., Nordquist, D. & McLoon, S. C. (1994). Correlation of nitric oxide synthase expression with changing patterns of axonal projections in the developing visual system. *J. Neurosci.*, 14:1746-1755.
120. Yamamoto, R., Brecht, D. S., Dawson, T.M., Snyder, S.H. & Stone, R.A. (1993a). Enhanced expression of nitric oxide synthase by rat retina following pterygopalatine parasympathetic denervation. *Brain Res.*, 631:83-88.
121. Yamamoto, R., Brecht, D. S. Snyder, S.H. & Stone, R.A. (1993b). The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neurosci.*, 54:189-200.
122. Yau, K.W. & Nakatani, K. (1985). Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal on outes segment. *Nature*, 313:579-582.

123. Yazulla, S & Kleinschmidt, J. (1980). The effects of intraocular injection of kainic acid on the synaptic organization of the goldfish retina. *Brain Res.*, 182:287-301.
124. Yin, H., Turetsky, D., Choi, D.W. & Weiss, J.H. (1994). Cortical neurones with  $Ca^{2+}$ -permeable AMPA/KA channels display distinct receptor immunoreactivity and are GABAergic. *Neurobiol. Dis.*, 1:43-49.
125. Zeevalk, G.D. & Nicklas, W.J. (1989). Excitotoxicity in chick retina caused by the unusual amino acids BOAA and BMAA: effects of MK-801 and DIDS. *Neurosci. Lett.*, 102:284-290.
126. Zeevalk, G.D. & Nicklas W.J. (1994). Nitric oxide in retina: relation to excitatory amino acids and excitotoxicity. *Exp. Eye Res.*, 58:343-350.