

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE BIOLOGÍA



\* 5 3 0 9 8 4 2 2 4 8 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**TRIPTÓFANO HIDROXILASA EN LOS FOTORRECEPTORES DE LA  
RETINA DE *XENOPUS LAEVIS*: REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
Y DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR EL FOTOPERIODO Y  
MENSAJEROS INTRACELULARES Y EXTRACELULARES.**

Vº Bº

El Director



**ARCHIVO**

Angel Luis Alonso Gómez

Ana Isabel Valenciano González

Memoria presentada por Ana Isabel Valenciano González  
para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, 24 de Abril de 1.998

Esta tesis doctoral ha sido realizada en los Departamentos de Biología Animal II de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid y en “Department of Pharmacology of Emory University School of Medicine”, Atlanta (E.E.U.U.).

Se contó con el apoyo económico prestado por las siguientes becas:

- Beca Complutense Predoctoral en España (U.C.M)
- Plan de Formación de Personal Investigador (M.E.C.):
  - Beca predoctoral en España
  - Beca predoctoral en el extranjero

Los trabajos de investigación estuvieron a cargo de los siguientes proyectos:

- DGICYT (PB 94-0236)
- NIH (RO1-EY04864)

Parte de los resultados correspondientes a esta Memoria han sido publicados en forma de Abstract en las siguientes revistas científicas.

**Soc. Neurosci. Abstr. Vol 23, Part 2, pp. 1325 (1997).**

**Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39:S237 (1998).**

**Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39:S568 (1998).**

## AGRADECIMIENTOS

Durante los 4 años que se han necesitado para completar esta tesis doctoral muchas son las personas que han contribuido, en mayor o menor medida, al resultado final de la misma, a todas ellas gracias.

De modo especial quiero agradecer al Dr. P.M. Iuvone por permitir las idas y venidas a su laboratorio, por no poner freno a mis ideas y por los mil y un consejos sobre los diseños experimentales. A su lado he aprendido dos de las cualidades que cualquier científico debe poseer, juicio crítico y dedicación plena. Gracias por enseñarme a pensar. Thank you very much, I really appreciate your help.

Gracias a los doctores J.C. Besharse, C.B. Green y P. Grève por el apoyo prestado a la realización de la parte molecular de esta memoria, sin su colaboración una parte importante de este trabajo no hubiera sido posible. Thanks. Merci.

A todas aquellas personas que han pasado por el laboratorio del Dr. P.M. Iuvone durante estos años por haberme acogido siempre de un modo amable y por haber tenido muchísima paciencia con mi inglés.

A mis amigos del otro lado del Atlántico: Mar, Tim y Rossani, por haber conseguido que me sintiera en Atlanta como en casa.

Entre las personas del departamento de Biología Animal II quiero agradecer de un modo muy especial a las doctoras M. Alonso-Bedate y M. J. Delgado por haberme aceptado en su grupo de investigación dándome la oportunidad de comenzar en el mundo de la Ciencia. Gracias por haberme enseñado las primeras bases para poder empezar a desarrollarme como científico.

A mis amigos del departamento de Biología Animal II por haber compartido los momentos buenos y malos y por echarme un cable siempre que lo he necesitado.

A mi director de tesis, A.L. Alonso-Gómez, le tengo muchísimas cosas que agradecer tantas que sería imposible enumerarlas por lo que simplemente diré, gracias por estar siempre a mi lado.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia y a mis amigos de siempre el apoyo incondicional mostrado durante todos estos años. Muchísimas gracias.

## ABREVIATURAS

AAAD: L-aminoácido aromático descarboxilasa

AC: Adenilato ciclasa

Acetil-CoA: Acetilcoenzima A

cAMP: AMP cíclico.

APB: Ácido aminofosfobutírico

DAG: Diacilglicerol.

ERG: Electroretinograma

GAD: Glutamato descarboxilasa.

cGMP: GMP cíclico.

GC: Guanilato ciclasa

mHBH: Hidroxibencilhidracina.

HIOMT: Hidroxindol-O-metiltransferasa.

5OHTrp: 5-Hidroxitriptófano.

i.p.: intraperitoneal.

KA: Ácido kaínico.

MAWQ: Medio de cultivo para anfibios

MABA (Medio 199 suplementado con albumina, bicarbonato y ácido ascórbico)

MBCQ: 4-[[3,4-(Metilendioxi)benzil]amino]-6-cloroquinazolino

NAT: Arilaquilamina (serotonina) N-acetyltransferasa

PH: Fenilalanina hidroxilasa.

PKA: *Proteína quinasa A*

PKC: *Proteína quinasa C*

PKG: *Proteína quinasa G*

PLC: Fosfolipasa C

p/v: Peso/volumen

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

SC: Solución salina de cultivo

TH: Tirosina hidroxilasa

TPH: Triptófano hidroxilasa

L-Trp: L-Triptófano

v/v: Volumen/volumen

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. <u>ANATOMÍA DE LA RETINA DE VERTEBRADOS</u></b> .....	2
1.1. <u>CAPAS DE LA RETINA</u> .....	2
1.2. <u>TIPOS DE CÉLULAS EN LA RETINA</u> .....	4
1.2.1. EPITELIO PIGMENTADO .....	4
1.2.2. CÉLULAS DE MÜLLER .....	5
1.2.3. FOTORRECEPTORES .....	6
1.2.4. CÉLULAS HORIZONTALES .....	8
1.2.5. CÉLULAS BIPOLARES .....	9
1.2.6. CÉLULAS AMACRINAS .....	9
1.2.7. CÉLULAS INTERPLEXIFORMES .....	10
1.2.8. CÉLULAS GANGLIONARES .....	10
<b>2. <u>NEUROTRANSMISORES DE LA RETINA</u></b> .....	11
2.1. <u>GLUTAMATO</u> .....	11
2.2. <u>GABA</u> .....	12
2.3. <u>GLICINA</u> .....	14
2.4. <u>ACETILCOLINA</u> .....	15
2.5. <u>NEUROPEPTIDOS</u> .....	16
2.5.1. SUSTANCIA P .....	16
2.5.2. NEUROPEPTIDO Y .....	16
2.5.3. SOMATOSTATINA .....	17
2.5.4. ENCEFALINAS .....	17
2.5.5. OTROS NEUROPEPTIDOS .....	17
2.6. <u>SEROTONINA</u> .....	18
2.7. <u>DOPAMINA</u> .....	20
2.8. <u>ADENOSINA</u> .....	24
<b>3. <u>MELATONINA</u></b> .....	26
3.1. <u>RUTA DE SÍNTESIS</u> .....	27
3.2. <u>REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA EN LA RETINA</u> .....	35
3.2.1. REGULACIÓN POR LA LUZ .....	35
3.2.2. REGULACIÓN POR NEUROTRANSMISORES RETINIANOS: DOPAMINA .....	40
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	42
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	45

1. <u>MATERIALES</u> .....	46
1.1. <u>PRODUCTOS</u> .....	46
1.2. <u>INSTRUMENTAL</u> .....	50
1.3. <u>ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</u> .....	52
2. <u>MÉTODOS</u> .....	52
2.1. <u>LESIONES OCULARES</u> .....	52
2.1.1. INYECCIONES INTRAOCULARES DE ÁCIDO KAÍNICO .....	52
2.1.2. LISIS DE LA RETINA INTERNA CON TRITON X-100 .....	54
2.2. <u>OBTENCIÓN DE LAS COPAS ÓPTICAS</u> .....	54
2.3. <u>CULTIVO DE COPAS ÓPTICAS</u> .....	54
2.4. <u>TÉCNICAS ANALÍTICAS</u> .....	56
2.4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPTÓFANO HIDROXILASA .....	56
2.4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEROTONINA N-ACETILTRANSFERASA .....	61
2.4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESCARBOXILASA (GAD) .....	63
2.4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE AMP CÍCLICO .....	65
2.4.5. DETERMINACIÓN DE LA ENTRADA DE CALCIO .....	67
2.4.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE PROTEÍNAS .....	68
2.4.7. DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS .....	69
2.4.8. DETERMINACION DEL mRNA DE LAS RETINAS NEURALES .....	71
2.5. <u>MICROSCOPIA ÓPTICA, PREPARACIONES HISTOLÓGICAS</u> .....	77
3. <u>DISEÑOS EXPERIMENTALES</u> .....	77
3.1. <u>LESIONES OCULARES</u> .....	78
3.1.1. EFECTO DEL ÁCIDO KAÍNICO .....	78
3.1.2. LISIS CON TRITON X-100 .....	78
3.2. <u>OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH <i>IN SITU</i></u> .....	78
3.2.1. COPAS ÓPTICAS INTACTAS .....	78
3.2.2. COPAS ÓPTICAS LESIONADAS CON KAINATO .....	80
3.3. <u>ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH</u> .....	80
3.3.1. REGULACIÓN POR FACTORES EXÓGENOS; EFECTO DEL FOTOPERIODO .....	80
3.3.2. REGULACIÓN POR SEGUNDOS MENSAJEROS Y POR NEUROTRANSMISORES .....	82
4. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS</u> .....	84
4.1. <u>ANÁLISIS DE LA VARIANZA</u> .....	84
4.2. <u>ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL</u> .....	85
4.3. <u>MODELO SINOSUIDAL</u> .....	85

<b>IV. RESULTADOS</b>	87
1. <u>LESIONES OCULARES</u>	88
1.1. <u>EFFECTOS DE LA INYECCIÓN DE ÁCIDO KAÍNICO</u>	88
1.2. <u>EFFECTOS DE LISIS CON TRITON X-100</u>	91
2. <u>OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH <i>IN SITU</i></u>	91
2.1. <u>ELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO</u>	91
2.2. <u>ÓPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA REACCIÓN PARA RETINAS INTACTAS</u>	94
2.3. <u>OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA REACCIÓN PARA RETINAS LESIONADAS CON KA.</u>	102
2.4. <u>COMPROBACIÓN DE LA LESIÓN OCULAR: CONTENIDO DE DOPAMINA Y SEROTONINA</u>	106
3. <u>ESTUDIOS SOBRE LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPTÓFANO HIDROXILASA EN COPAS ÓPTICAS LESIONADAS CON KA</u>	114
3.1. <u>REGULACIÓN POR FACTORES EXÓGENOS: EFECTO DEL FOTOPERÍODO</u>	114
3.2. <u>REGULACIÓN ENDÓGENA: PAPEL DE LOS SEGUNOS MENSAJEROS</u>	122
3.2.1. REGULACIÓN POR cAMP	122
3.2.2. REGULACIÓN POR CALCIO	133
3.2.3. REGULACIÓN POR cGMP	151
3.3. <u>REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA POR NEUROMODULADORES</u>	156
3.3.1. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH POR DOPAMINA	156
3.3.2. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA POR ADENOSINA.	163
<b>V. DISCUSIÓN</b>	177
1. <u>LESIÓN DE LA RETINA CON EL ÁCIDO KAÍNICO COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA.</u>	178
2. <u>REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH EN CÉLULAS FOTORRECEPTORAS.</u>	183
2.1. <u>REGULACIÓN POR FACTORES EXÓGENOS: EFECTO DEL FOTOPERIODO.</u>	183
2.2. <u>REGULACIÓN POR FACTORES ENDÓGENOS: PAPEL DE LOS SEGUNDOS MENSAJEROS</u>	187
2.2.1. PAPEL DEL cAMP	188
2.2.2. PAPEL DEL CALCIO	192
2.2.3. PAPEL DEL cGMP.	198
2.3. <u>REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA POR NEUROMODULADORES.</u>	201
2.3.1. PAPEL DE LA DOPAMINA EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH	201
2.3.2. PAPEL DE LA ADENOSINA EN LA SÍNTESIS DE MELATONINA	204
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	207
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	211

## **I. INTRODUCCIÓN**

## **1. ANATOMÍA DE LA RETINA DE VERTEBRADOS**

La retina de los vertebrados está formada por dos capas con estructura celular distinta. El **epitelio retiniano o pigmentado** es la capa más externa en íntimo contacto con la coroides. Como su nombre indica, es un epitelio uniestratificado de origen neuroepitelial. Sus células se caracterizan por poseer una gran cantidad de gránulos de melanina en su citoplasma. La misión principal de esta capa es absorber la luz no captada por los fotorreceptores y servir de pantalla para evitar que la luz que incide por la parte posterior del globo ocular llegue a los fotorreceptores confiriendo de este modo direccionalidad a la visión. La capa más interna es la **retina neural**. Esta capa está formada exclusivamente por tejido nervioso, encontrándose solamente neuronas y células glias (Reichnbach y Robison, 1995). En este apartado nos centraremos únicamente en la descripción anatómica de la retina neural.

### **1.1. CAPAS DE LA RETINA**

La retina neural de los vertebrados posee dos características fundamentales. Es una retina invertida, por tanto la luz deber atravesar el resto de las neuronas antes de alcanzar a los fotorreceptores que se encuentran en la parte más profunda (Land y Fernald, 1992). La segunda característica es su estructura laminar. La retina neural se puede dividir en una serie de estratos que a continuación se describen brevemente, comenzando desde la capa más externa, o próxima al epitelio pigmentado, hacia la más interna. La nomenclatura utilizada para las abreviaturas de las capas retinianas es la aceptada por la comunidad científica:

#### **a) Capa de los segmentos externos (OS)**

Es la capa más externa y se encuentra embebida en el epitelio pigmentado. Está formada por los segmentos externos de los fotorreceptores y, por tanto, es la única parte fotosensible de la retina.

#### **b) Capa de los segmentos internos (IS).**

En esta capa se localiza la parte del cuerpo celular de los fotorreceptores que se encuentra en contacto con el segmento externo y se denomina segmento interno. Es la encargada de satisfacer las necesidades metabólicas de la fotorrecepción.

**c) Capa nuclear externa (ONL).**

En esta capa se localizan los núcleos de las células fotorreceptoras.

**d) Capa plexiforme externa (OPL).**

En esta capa se localizan los axones de los fotorreceptores y las dendritas de las neuronas de la INL. Por tanto, tiene lugar los contactos sinápticos entre éste tipo celular, las células bipolares y las células horizontales.

**e) Capa nuclear interna (INL).**

En esta capa se encuentran los núcleos de la mayoría de las neuronas de la retina. De este modo, los núcleos de las células horizontales se encuentran en la parte más externa y sus axones se extienden horizontalmente. Los núcleos de las neuronas bipolares se encuentran en el centro y sus axones se extienden verticalmente. Los núcleos de las células amacrinas e interplexiformes se encuentran en la parte más interna y sus axones se extienden radialmente a la IPL. En esta capa también se localizan los núcleos de las principales células gliales de la retina, las células de Müller.

**f) Capa plexiforme interna (IPL).**

En esta capa se localizan los contactos sinápticos entre las células bipolares, amacrinas y ganglionares. Esta capa puede subdividirse a su vez en dos sublamina:

- **Sublamina a:** Mitad más externa en contacto con la INL. En esta capa se realizan los contactos sinápticos entre las células bipolares y ganglionares OFF.
- **Sublamina b:** Mitad más interna en contacto con la GCL. En esta capa se realizan los contactos sinápticos entre las células bipolares y ganglionares ON.

La IPL también puede dividirse en 5 estratos siendo el estrato 1 el más cercano a la INL y el estrato 5 el más próximo a la GCL (Ramón y Cajal, 1892)

**g) Capa de las células ganglionares (GCL).**

En esta capa se localizan los núcleos de las células ganglionares.

## **h) Capa de las fibras ópticas.**

Constituida por los haces de los axones de las células ganglionares. Una vez que abandonan el ojo forman el nervio óptico, que constituye la vía de transmisión de la información visual al sistema nervioso central.

En algunos géneros de anuros (*Rana*, *Xenopus*) se han descrito fibras retinopetales en el nervio óptico, contienen en su mayoría sustancia P, y corresponden a cuerpos neuronales dispuestos en la *lamina terminalis* en el área septopreóptica (hipotálamo). Su importancia funcional se desconoce en la actualidad (Uchiyama *et al.*, 1988).

La estructura laminar o estratificada de la retina se conserva en toda su extensión, pero la densidad celular varía. Los anuros terrestres poseen una banda desde el extremo temporal al nasal de la zona ecuatorial de la retina, denominada **banda visual**. Dicha zona tiene una densidad neuronal y de conos superior al resto de la retina, (Tsukamoto, 1987; Zhang y Straznicky, 1991). Podría considerarse una estructura análoga a la fovea de los primates, cuya función sería aumentar la agudeza visual facilitando la captura de presas vivas. Dicha banda visual no se observa en las especies de anuros totalmente acuáticos, como el género *Xenopus* (Zhu *et al.*, 1990).

## **1.2. TIPOS DE CÉLULAS EN LA RETINA**

### **1.2.1. EPITELIO PIGMENTADO**

El epitelio pigmentado es una capa de células epiteliales que se encuentran entre la coroides y la capa de células fotorreceptoras. Morfológicamente sus células son hexagonales y oscuras. La asimetría es la principal característica de las células del epitelio pigmentado, jugando un papel muy importante en su función. La parte basal (cercana al endotelio coroidal) se encuentra muy replegada para facilitar el intercambio de nutrientes y desechos metabólicos entre el epitelio pigmentado y el endotelio vascular retiniano. Además, las secreciones de la parte basal de las células del epitelio pigmentado constituyen la lámina basal. Esta lámina basal se encuentra físicamente separada de la lámina basal del endotelio vascular coroidal por un espacio de matriz extracelular. Ambas láminas basales junto a la matriz extracelular constituye lo que se denomina membrana de Bruch's (Hewitt, 1986). Fisiológicamente, la membrana de Bruch's constituye la denominada **barrera hematorretiniana** (Vinores, 1995). Por tanto, una de las principales

funciones del epitelio pigmentado es el intercambio de sustancias entre la circulación sanguínea y la retina.

La superficie de la parte apical (cercana a los fotorreceptores) también se encuentra muy replegada, mostrando interdigitaciones de distinto tamaño que facilitan el intercambio de sustancias entre las células del epitelio y los fotorreceptores. Las interdigitaciones cortas envuelven los segmentos externos de conos y bastones, mientras que las interdigitaciones largas se proyectan a lo largo de los segmentos externos. Las membranas plásmaticas de las células del epitelio pigmentado y los fotorreceptores se encuentran separadas físicamente por una capa muy estrecha de matiz extracelular denominada **matriz interfotorreceptora**. Se cree que las interdigitaciones y la matriz interfotorreceptoras son las responsables de la adhesión retiniana (Ostwald y Steinberg, 1980).

Lateralmente, las células del epitelio pigmentado están unidas por complejos de unión que incluyen la *zonula adherens* (formada por desmosomas), uniones tipo GAP y en la parte más apical la *zonula occludens*. Esta última zona apical se denomina **Membrana de Verhoeff** (Rodieck, 1973) o barra terminal (Clark, 1986). Todas estas uniones contribuyen de forma importante a la integridad de la barrera hematorretiniana.

Finalmente, el citoplasma de las células del epitelio pigmentado poseen una serie de orgánulos específicos como las gotas lipídicas (almacenan principalmente vitamina A y otros retinoides), los gránulos de melanina y los fagosomas que intervienen activamente en la protección, mantenimiento y renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores.

### 1.2.2. CÉLULAS DE MÜLLER

Son las principales células gliales de la retina neural. Juegan un papel importante en el mantenimiento neuronal suministrando nutrientes, reciclando neurotransmisores y eliminando desechos metabólicos y aislando las sinapsis de los impulsos químicos o eléctricos de otras sinapsis vecinas (Reichenbach y Robinson 1995). Morfológicamente se caracterizan por poseer largas prolongaciones que se extienden ocupando el ancho total de la retina neural. En la cara externa, las células de Müller están en contacto con los segmentos internos de los fotorreceptores mediante complejos de unión formando la **membrana limitante externa**. En la cara vitreal, los

extremos de estas células se unen entre sí mediante complejos de unión incluyendo *zonula adherens*, formando la **membrana limitante interna**.

### 1.2.3. FOTORRECEPTORES

Los fotorreceptores son las células de la retina que van a captar la señal luminosa e iniciar la transmisión de la información visual. La célula fotorreceptora de los vertebrados puede dividirse en una serie de regiones morfológica y funcionalmente especializadas:

#### · Segmento externo:

Es un orgánulo membranoso procedente de la membrana plasmática que se caracteriza por su estructura lamelar formada por discos apilados y dispuestos perpendicularmente al eje del fotorreceptor. En las membranas de estos discos se localizan los pigmentos visuales (opsina) (Besharse, 1986).

#### · Segmento interno:

Es la parte del fotorreceptor que se encuentra entre el segmento externo y el núcleo celular. Se caracteriza por la presencia de orgánulos específicos:

- Cilio. Carece de microtúbulos centrales y se encuentra en contacto con los segmentos externos. Su función es estructural manteniendo la diferenciación entre las membranas del segmento externo e interno (Besharse, 1986).
- Gota lipídica. Está compuesta por lípidos insaturados coloreados por carotenoides. Su función es actuar como un filtro de color, o funcionar como una lente convergente enfocando la luz incidente sobre los segmentos externos. Únicamente está presente en los conos de algunas especies.
- Elipsoide. Está formado por una agregación de mitocondrias encargadas de la producción de energía necesaria para la función visual.
- Paraboloide. Gránulos de glucógeno que podrían ser un almacén de reserva para la actividad metabólica del segmento interno.
- Mioide. Es la región del segmento interno que contiene el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi. En esta zona tiene lugar la síntesis de proteínas del fotorreceptor, incluyendo los propios pigmentos visuales (Bird *et al.*, 1988). El mioide es capaz de modificar su longitud

mediante cambios en su citoesqueleto como respuesta a estímulos luminosos (movimientos retinomotores).

- **Cuerpo celular.**

Es la región que contiene el núcleo celular.

- **Cuerpo sináptico.**

Es la terminación especializada donde se producen los contactos sinápticos entre las células bipolares y horizontales.

Atendiendo a la intensidad luminosa a la que respondan y a la morfología de sus segmentos externos los fotorreceptores se pueden dividir en dos tipos:

**a) Bastones**

Los bastones están adaptados para llevar a cabo su función a baja intensidad luminosa. Morfológicamente se caracterizan por sus segmentos externos cilíndricos, alargados y de gran tamaño (Zhang y Straznicky, 1991). Los discos membranosos son independientes de la membrana plasmática siendo orgánulos intracelulares. Sus núcleos se sitúan en la mitad exterior de la ONL. En los anuros se han descrito dos subtipos distintos atendiendo a su morfología y a la naturaleza del pigmento visual (Witkovsky *et al.*, 1981; Zang y Straznicky, 1991):

- **Bastones de  $\lambda$  larga:** Son los mayoritarios. Su máximo de absorción se encuentran entre 523 y 502 nm dependiendo de la especie y sus terminales sinápticos se encuentran en la zona más externa de la OPL.

- **Bastones de  $\lambda$  corta:** Son más pequeños y menos numerosos. Su máximo de absorción se encuentra entre 432 y 445 nm y sus terminales sinápticos se encuentran en la zona más interna de la OPL.

**b) Conos**

Los conos llevan a cabo su función bajo condiciones de iluminación alta y poseen una gran resolución espacial y temporal. Son los encargados de la visión en color. Morfológicamente se caracterizan por sus segmentos externos de forma cónica, longitud corta y sus discos membranosos son repliegues apilados de la membrana plasmática. Sus núcleos celulares se sitúan

en la mitad interior de la ONL y sus terminales sinápticos se encuentran en la zona media de la OPL (Zhang y Straznicky, 1991).

En los anuros los conos pueden aparecer como:

- **Conos simples:** Se caracterizan por la posesión de una gota lipídica en el segmento interno. En *Xenopus laevis*, los conos simples se subdividen a su vez en dos (Saxen, 1954):

· Conos grandes: Son muy numerosos. Muestran movimientos fotomecánicos (Röhlich *et al.*, 1989). La mayoría (aproximadamente el 90%) son sensibles al rojo (máximo de absorción a 611 nm), existiendo una pequeña población sensibles al azul (Zhang *et al.*, 1994).

· Conos enanos: Su número es pequeño. Son inmóviles y probablemente son sensibles al ultravioleta (Zhang *et al.*, 1994).

- **Conos dobles:** Son dos conos adosados mediante uniones en sus membranas. El elemento principal de la pareja es idéntico a un cono simple. El cono accesorio posee el mismo pigmento que los bastones rojos, sus segmentos externos son más largos y finos y su segmento interno acumula glucógeno (paraboloide) (Röhlich *et al.*, 1989).

#### 1.2.4. CÉLULAS HORIZONTALES

Las células horizontales se caracterizan por tener sus núcleos en la INL y todas sus terminaciones sinápticas dentro de la OPL. Funcionalmente las células horizontales de los anuros, se pueden dividir en dos subtipos atendiendo al tipo de respuesta que procesen:

##### a) **Células lumínicas**

Son aquellas que se hiperpolarizan por todas las  $\lambda$  de la luz visible. Morfológicamente se caracterizan por poseer un axón largo sin arborización terminal. Su cuerpo celular es redondeado u oval y se localiza en la mitad externa de la INL. Sinaptan con todas las clases de conos y con los bastones de  $\lambda$  larga (Witkovsky *et al.*, 1988a; Witkovsky *et al.*, 1995).

##### b) **Células crómicas (tipo C)**

Son las implicadas en la respuesta cromática (Ogden *et al.*, 1985; Stone *et al.*, 1990), recibiendo información de  $\lambda$  corta de los bastones e información de  $\lambda$  larga de los conos rojos (Denton y Willey, 1955; Ogden *et al.*, 1985). Morfológicamente se caracterizan por ser de gran tamaño y carecer de axón. En *Xenopus laevis*, el cuerpo celular es ovalado y está situado en la

mitad externa de la INL. En la mayoría de las células, del cuerpo celular parten 6 dendritas que posteriormente se bifurcan originando de 4 a 7 ramas que recorren horizontalmente la OPL donde sinaptan con los fotorreceptores (Stone *et al.*, 1990).

### **1.2.5. CÉLULAS BIPOLARES**

Son células alargadas cuyo núcleo se encuentra en la mitad externa de la INL. Se caracterizan porque su árbol dendrítico se encuentra dirigido hacia la OPL, donde se ramifica profusamente, mientras que su axón se dirige hacia la IPL. En los anfibios anuros se han descrito dos subtipos morfológicos:

#### **a) Células bipolares grandes (o externas)**

Morfológicamente se caracterizan por su campo dendrítico amplio. Establecen sinapsis con los conos y con los bastones de  $\lambda$  larga.

#### **b) Células bipolares pequeñas (o internas)**

Son de menor tamaño y llegan a contactar con la superficie del neuroepitelio. Poseen una prolongación distal que se extiende hacia la matriz interfotorreceptora que se denomina filamento de Landolt y es un resto del estado de neuroblasto (Wrong-Riley, 1974).

### **1.2.6. CÉLULAS AMACRINAS**

Las células amacrinas son una clase muy heterogénea de interneuronas que intervienen en la interacciones laterales que ocurren en la IPL y se caracterizan por carecer de un axón. Debido a su gran heterogeneidad se han aplicado múltiples criterios para su clasificación como el tamaño y localización de su cuerpo celular (en la INL o en la GCL, denominándose estas últimas células amacrinas desplazadas), y la organización (difusas o estratificadas) y extensión (ancho, medio o estrecho) de sus árboles dendríticos. Funcionalmente, se pueden clasificar en 3 tipos (Morgan, 1992):

- Intervienen directamente en la transmisión de la información visual.
- Intervienen en la modulación de la transmisión visual.
- Intervienen en las funciones que permiten la transmisión de la información visual.

Debido a su función característica, la única subclase de células amacrinas que se denomina de igual forma en la mayoría de los trabajos y que está presente en todas las clases de vertebrados es la denominada célula amacrina AII. Son aquellas interneuronas glicinérgicas especializadas en la transmisión de la información visual desde el circuito de los bastones al de los conos (Famiglietti y Kolb, 1975). Reciben la información de las células bipolares de la vía de los bastones y establecen sinapsis químicas inhibitorias con la células ganglionares OFF de la vía de los conos en la sublámina a de la IPL, y uniones tipo GAP con los terminales axónicos de las células bipolares ON de la vía de los conos en la sublámina b.

### 1.2.7. CÉLULAS INTERPLEXIFORMES

Es el subtipo celular descrito más recientemente. Pueden considerarse un subtipo especial de células amacrinas cuyos arboles dendríticos se encuentran en la IPL y sus terminales axónicos en la OPL (Kolb y West, 1977). Concretamente en *Xenopus laevis*, se diferencian de las células amacrinas únicamente en la posesión de un axón que contacta en la OPL con células bipolares y horizontales (Rayborn *et al.*, 1981, Witkovsky *et al.*, 1988b).

### 1.2.8. CÉLULAS GANGLIONARES

Las células ganglionares se caracterizan porque su cuerpo celular esta localizado en la GCL y sus axones forman el nervio óptico. Sus árboles dendríticos son difusos y se extienden por la IPL.

En anuros, la morfología de este tipo celular es muy variable dependiendo de la especie estudiada. Las clasificaciones se basan normalmente en el tamaño de cuerpo celular y la forma del árbol dendrítico (Frank y Hollyfield, 1987a; Straznicky *et al.*, 1990).

Recientemente se ha descrito un subtipo de células ganglionares cuyas dendritas tienen contactos con las dos capas plexiformes (IPL y OPL), su número es reducido y su importancia fisiológica se desconoce (Tóth y Straznicky, 1989).

## **2. NEUROTRANSMISORES DE LA RETINA**

El conocimiento actual de la neuroquímica de la retina está bastante avanzado habiéndose descrito que la mayoría de los neurotransmisores cerebrales se encuentran también en la retina. En la última década los avances en los métodos de inmunohistoquímica han permitido correlacionar la localización de cada neurotransmisor con una subpoblación específica de neuronas retinianas.

En el siguiente apartado revisaremos brevemente la localización, función y tipos de receptores de los principales neurotransmisores de la retina. La serotonina, dopamina y adenosina serán tratados con más detalle. Así mismo, debido a la falta de estudios en otras clases de vertebrados este apartado se basará principalmente en lo descrito para mamíferos.

### **2.1. GLUTAMATO**

El glutamato se puede considerar como el neurotransmisor excitador más importante de la retina. Es el neurotransmisor iniciador (o guía) de la transmisión de la información luminosa por la vía directa que implica una célula fotorreceptora, una bipolar y una ganglionar (Massey, 1990). Tanto los conos como los bastones presentan una elevada inmunorreactividad para aspartato aminotransferasa, enzima encargada de la síntesis de glutamato (Slaughter y Miller, 1983), y para glutamato (Ehinger *et al.*, 1988; Crooks y Kolb, 1992; Kalloniatis y Fletcher, 1993), produciéndose la liberación de este neurotransmisor en oscuridad, cuando dichas células se encuentran despolarizadas. Esta liberación regulada por la luz ha sido demostrada por Miller y Schwartz (1983) en los fotorreceptores de *Bufo* y en reptiles (Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen y Jarh, 1989). Así mismo, también se ha demostrado la existencia de neuronas glutaminérgicas entre las células bipolares y ganglionares (Ehinger *et al.*, 1988; Massey y Miller, 1988; Marc *et al.*, 1990; Tachinaba y Okada, 1991; Crooks y Kolb, 1992; Kalloniatis y Fletcher, 1993).

El glutamato liberado por un único cono va a actuar sobre dos tipos de neuronas bipolares de segundo orden, produciendo efectos contrarios en cada una de ellas en función del tipo de receptor de glutamato que se encuentre en su membrana. De este modo las células OFF (hiperpolarizadas en luz) poseen receptores ionotrópicos y simplemente van a transmitir la señal

de despolarización iniciada por los fotorreceptores. Las células ON (despolarizadas en luz) poseen receptores tipo metabotrópico que van a mostrar un estado hiperpolarizado en oscuridad bloqueando la señal.

Los receptores de glutamato se pueden dividir en 2 grandes clases: receptores ionotrópicos, que constituyen un canal de cationes activados por ligando, y receptores metabotrópicos, que están acoplados, mediante proteínas G, a las cascadas de segundos mensajeros. Los receptores ionotrópicos a su vez se subdividen en receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), de kainato y de  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA). Estudios de hibridación *in situ* han revelado la presencia de receptores ionotrópicos tipo AMPA (GluR-1, GluR-2, GluR-3, GluR-4) y kainato (GluR-6, GluR-7) por toda la retina con mayor abundancia en células horizontales y bipolares largas (Peng *et al.*, 1995), aunque también se han descrito en células amacrinas y ganglionares (Aizeman *et al.*, 1988; Massey y Miller, 1988; Dixon y Copenhagen, 1992; Yazejian y Fain, 1992). Así mismo, se han localizado receptores NMDA tipo NR2A en la mayoría de las células ganglionares y en una subpoblación de células amacrinas (Hartveit *et al.*, 1994). En la retina, también han sido descritos 7 tipos de receptores metabotrópicos de los que 3 de ellos son sensibles a APB (mGluR4, mGluR6, mGluR7). Estudios de inmunohistoquímica han localizado mGluR6 en posición postsináptica en las células bipolares de los conos de mamíferos (Nomura *et al.*, 1994; Laurie *et al.*, 1997) y en células horizontales de vertebrados no mamíferos (Takashashi y Copenhagen, 1992).

Finalmente, se han descrito sistemas de recaptura para glutamato en los fotorreceptores de peces (Marc y Lamb, 1981) y anfibios (Lamb *et al.*, 1982; Eliasof y Werblin, 1993; Grant y Werblin, 1996, Yang y Wu, 1997), en determinadas subpoblaciones de células bipolares de la vía de los conos de mamíferos (Raunen y Kramer, 1994), en células horizontales de reptiles (Schutte y Schlemmer, 1993) y en células de Müller de anfibios (Yang y Wu, 1997).

## 2.2. GABA

En todas las clases de vertebrados, la presencia de GABA y de glutamato descarboxilasa (GAD, enzima responsable de la síntesis de GABA a partir de glutamato) ha sido descrita en las células horizontales, numerosos tipos de células amacrinas y un pequeño número de células ganglionares (Brandon *et al.*, 1980; Ball *et al.*, 1988; Carusso *et al.*, 1989; Grabiell *et al.*, 1992;

Kalloniatis y Fletcher, 1993; Bennis y Versaux-Botteri, 1995). En la mayoría de los vertebrados estudiados, las células amacrinas que se marcan con inmunorreactividad para GABA son aproximadamente el 30% de todas las células amacrinas y son generalmente neuronas de campo dendrítico ancho (Ball *et al.*, 1988; Carusso *et al.*, 1989). Una de las características de las células amacrinas GABAérgicas es su frecuente colocalización con otras sustancias neuroactivas como indolaminas (Zhu y Straznicky, 1993), dopamina (Wässle y Chun, 1988), acetilcolina (Vaney y Young, 1988) y neuropéptidos.

El GABA actúa a través de 2 tipos de receptores: ionotrópicos (GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>) y metabotrópicos (GABA<sub>B</sub>) (Djamoz, 1995), pudiendo ser considerado como el neurotransmisor inhibitor más importante de la retina. Los receptores GABA<sub>A</sub> median los efectos sinápticos rápidos y son heteropentámeros que pueden presentar distintas combinaciones constituyendo un canal de cloro. Hasta la fecha, se han clonado 13 subunidades diferentes del cerebro de rata, 9 de las cuales se han localizado por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en la IPL de la rata (Greferath *et al.*, 1995). Estudios fisiológicos han demostrado la presencia receptores GABA<sub>A</sub> en los terminales de los fotorreceptores reflejando los efectos inhibidores de las células horizontales sobre las células sensoriales de primer orden (Kanedo y Tachibana, 1986; Wu, 1991; Stone *et al.*, 1990). Así mismo, estudios inmunohistoquímicos localizan receptores GABA<sub>A</sub> en los terminales dendríticos y axónicos de las células bipolares (Vardi y Sterling, 1993). Estos datos confirman la transmisión de información desde las células horizontales a las bipolares en la OPL y la retroalimentación negativa que las células GABAérgicas amacrinas ejercen sobre los terminales de las neuronas bipolares (Zang y Yang, 1997).

Los receptores GABA<sub>B</sub> se encuentran acoplados a canales de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> a través de proteínas G y median funciones como la inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores o la modulación del balance entre señales sostenidas y transitorias dentro de la retina (Slaughter, 1995).

El receptor GABA<sub>C</sub> es un homopentámero que constituye un canal de cloro. Estos receptores se han localizado en células horizontales donde funcionan como autorreceptores, limitando la propia liberación de GABA por estas neuronas (Kammermans y Werblin, 1992), y participan en el acoplamiento químico entre células horizontales vecinas (Takahashi *et al.*, 1995).

También se ha descrito la presencia de receptores GABA<sub>C</sub> en las células bipolares (Feigenspan *et al.*, 1993; Qian y Dowling, 1995). Por tanto, la retroalimentación negativa de las células GABAérgicas amacrinas sobre las neuronas bipolares estaría modulada conjuntamente por receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> (Pan y Lipton, 1995; Qian y Dowling, 1995; Zangh *et al.*, 1997).

Aunque la mayor liberación del GABA ocurre por un mecanismo dependiente de calcio a través de vesículas sinápticas, también se ha descrito un mecanismo de liberación no vesicular e independiente de calcio (Schwartz, 1987). Este último mecanismo se cree que se realiza a través de un transportador de GABA cuando la concentración de Na<sup>+</sup> intracelular es elevada. Estudios recientes sugieren que en la retina existen 3 subtipos de transportadores de GABA con distinta localización (Honda *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1996).

### 2.3. GLICINA

Estudios de autorradiografía e inmunohistoquímica han demostrado que, en la retina de vertebrados, la glicina se encuentra en casi la mitad de las células amacrinas, en una subpoblación de las células bipolares de la vía de los conos y en algunas células ganglionares (Voaden *et al.*, 1974; Eldred y Cheung, 1989; Pourcho y Goebel, 1990; Sherry *et al.*, 1993; Kalloniatis y Fletcher, 1993). En mamíferos, entre los tipos de células marcadas con [<sup>3</sup>H]glicina se encuentran las neuronas amacrinas AII, A3, A4 y A8 (Pourcho y Goebel, 1985; Crooks y Kolb, 1992). En anfibios, concretamente en *Xenopus laevis*, se han descrito células interplexiformes glicinérgicas (Rayborn *et al.*, 1981) que poseen contactos presinápticos con las células horizontales externas (Smiley y Yazulla, 1990) y cuya función es despolarizar las células horizontales provocando la liberación de GABA (Smiley y Basinger, 1990).

Los receptores de glicina son canales iónicos que se caracterizan por su sensibilidad a la estricnina y su capacidad para conducir cloro. Estos receptores son normalmente heteropentámeros de dos tipos de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Bourmann *et al.*, 1993). Estudios de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* realizados en la retina de rata han demostrado una distribución diferencial de los distintos tipos de subunidades  $\alpha$  sugiriendo una diversidad funcional de los receptores de glicina en la retina (Greferath *et al.*, 1994). De este modo, la subunidad  $\alpha_1$  está presente en los contactos sinápticos que establecen las células glicinérgicas amacrinas AII con las células bipolares OFF de la vía de los conos y las células ganglionares OFF (Sassoe-Pognetto

*et al.*, 1994; Grunert y Wassle, 1996). Por tanto, estas sinapsis juegan un papel muy importante en la transmisión de las señales de visión en oscuridad mediante la vía de los conos. Así mismo, la distribución y función de los receptores de glicina también depende de la clase de vertebrado estudiada. De este modo, se ha descrito la presencia de receptores de glicina en las células horizontales H2 y H4 de teleosteos (Zhou *et al.*, 1993) y anfibios (Borges y Wilson, 1991; Gilbertson *et al.*, 1991), pero no de reptiles (Zucker y Ehinger, 1993). En reptiles, la mayoría de los receptores de glicina se localizan en células amacrinas (Zucker y Ehinger, 1993).

Finalmente, de los 3 tipos de transportadores para glicina identificados hasta la fecha en el sistema nervioso, 2 han sido localizados en la retina (Borowsky *et al.*, 1993). Concretamente, el transportador GLYT1 se localiza en las células amacrinas (Zafra *et al.*, 1995).

#### **2.4. ACETILCOLINA**

En todas las clases de vertebrados, la acetilcolina se localiza en dos subpoblaciones de neuronas amacrinas que se caracterizan por tener una morfología especial, denominándose células estrelladas (o "starburst") (Famiglietti, 1983; Eckenstein y Thoenen, 1982; Voight, 1986). Son células amacrinas de campo dendrítico ancho. El primer grupo son neuronas amacrinas con núcleo en la INL y cuyos árboles dendríticos se ramifican en el estrato 2 de la IPL. El segundo grupo lo constituyen células amacrinas desplazadas cuyo núcleo se localiza en la GCL y cuyas ramificaciones se extienden en el estrato 4 de la IPL (Baughman y Bader, 1977; Masland y Mills, 1979).

La acetilcolina ejerce sus funciones a través de 2 tipos de receptores: metabotrópicos (muscarínicos), o ionotrópicos (nicotínicos). Estudios fisiológicos demuestran la presencia de receptores nicotínicos en las células ganglionares de mamíferos (Lipton *et al.*, 1987, Kaneda *et al.*, 1995). Hasta el momento, en la retina se ha descrito la presencia de 3 tipos de receptores sensibles a  $\alpha$ -bungarotoxina en función de las subunidades  $\alpha$  que presenten:  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$ , o ambas (Anand *et al.*, 1993).

Los receptores muscarínicos, se caracterizan por estar acoplados a proteínas G. Estudios autorradiográficos localizan este tipo de receptores principalmente en la IPL (Polans *et al.*, 1985).

En anfibios, también se ha descrito la presencia de receptores muscarínicos en la OPL (Townes-Anderson y Vogt, 1989).

## 2.5. NEUROPEPTIDOS

En la retina de todas las clases de vertebrados se han descrito un gran número de neuropéptidos como colecistocinina, somatostatina, sustancia P, glucagón, VIP, neuropéptido Y, etc. En la mayoría de los casos, la función de estos neuropéptidos en la retina no ha sido determinada, por lo que en este apartado revisaremos la escasa información existente.

### 2.5.1. SUSTANCIA P

Estudios inmunohistoquímicos han localizado sustancia P en la retina de peces (Brecha *et al.*, 1981), anfibios (Eskay *et al.*, 1981), reptiles (Osborne *et al.*, 1982), aves (Osborne *et al.*, 1982) y mamíferos (Brecha *et al.*, 1982). Este neuropéptido se localiza en las células amacrinas de todas las especies estudiadas, aunque dependiendo de la especie también puede hallarse en células amacrinas desplazadas e incluso en algunas subpoblaciones de células ganglionares (Unger *et al.*, 1981; Vaney y Whittington, 1986; Ehrlich *et al.*, 1987). En anuros, la inmunorreactividad para sustancia P se localiza en una subpoblación de células amacrinas cuyo cuerpo celular es redondeado y se encuentra en la INL y cuyas prolongaciones dendríticas se ramifican en la IPL, principalmente en los estratos 3 y 4 con una pequeña proporción en el estrato 1 (Hiscock y Straznicky, 1989; Zhu y Gibbins, 1995). Una de las características de todos los neuropéptidos es su colocación con otras sustancias neuroactivas. En anfibios la sustancia P se colocaliza en células amacrinas con GABA (Watt *et al.*, 1993; Main *et al.*, 1993) y glicina (Watt y Florack, 1993a) y, en las especies donde se encuentra en células ganglionares, al menos una subpoblación de éstas es GABAérgica (Watt *et al.*, 1994).

### 2.5.2. NEUROPEPTIDO Y

Estudios inmunohistoquímicos han localizado neuropéptido Y únicamente entre las células amacrinas de la retina en todas las clases de vertebrados (Brunn *et al.*, 1986; Osborne *et al.*, 1985; Isayama y Eldred, 1988; Straznicky y Hiscock, 1994; Hutsler y Chalupa, 1994). En anfibios, estas células amacrinas se caracterizan por tener el cuerpo celular localizado en la fila de núcleos más interna de la INL y porque sus árboles dendríticos se ramifican en los estratos 1, 2, y 4 de la IPL (Zhu y Gibbins, 1995). En anuros, todas las células amacrinas inmunorreactivas para el

neuropéptido Y también contienen GABA (Main *et al.*, 1993). En la retina de mamíferos, estudios fisiológicos demuestran que los receptores Y<sub>2</sub> se encuentran acoplados negativamente a la adenilato ciclasa en la retina de conejos (Bruun *et al.*, 1994)

### 2.5.3. SOMATOSTATINA

La somatostatina se localiza en las células amacrinas y células amacrinas desplazadas de todas las clases de vertebrados (Unger *et al.*, 1981; Wagner y Zeutzi, 1987; Adolph y Zucker, 1988; Traina *et al.*, 1994; Larsen, 1995; Rickman *et al.*, 1996; Lugo y Blanco, 1997). En anfibios, estas células se caracterizan por poseer sus núcleos celulares o en la parte más interna de la INL o en la GCL y sus procesos sinápticos en la IPL (Smiley y Basinger, 1986, 1989; Watt y Florack, 1991a; Larsen 1995). En urodolos, la gran mayoría de las células amacrinas desplazadas que muestran inmunorreactividad para somatostatina también contienen GABA pero no glicina (Watt y Florack, 1993b). Sin embargo, en anuros, la somatostatina se colocaliza con glicina en una subpoblación de células amacrinas (Smiley y Basinger, 1988, 1989). Además, en la retina de mamíferos se han caracterizado sitios de unión para somatostatina (Valencia *et al.*, 1992; Liapakis *et al.*, 1993).

### 2.5.4. ENCEFALINAS

Estudios inmunohistoquímicos localizan encefalinas en células ganglionares desplazadas de aves (Britto y Hamassaki-Britto, 1993) y células amacrinas de todas las clases de vertebrados (Altschuler *et al.*, 1982; Eldred y Karten, 1983; Watt *et al.*, 1985; Watt, 1989; Britto y Hamassaki-Britto, 1993). En anfibios, las células amacrinas encefalinérgicas se caracterizan por tener sus núcleos en la INL y sus ramificaciones en la IPL (Watt *et al.*, 1985)

Al igual que lo descrito para otros neuropéptidos las neuronas que contienen encefalinas también muestran inmunorreactividad para otros neurotransmisores como GABA, glicina, neurotensina y somatostatina (Zhang y Eldred, 1992; Watt y Florack, 1991a y b, 1993c, 1994; Watt y Glazebrook, 1994), aunque su patrón de colocalización depende de la especie estudiada.

### 2.5.5. OTROS NEUROPEPTIDOS

Estudios de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* localizan el péptido intestinal vasoactivo (VIP) en las células amacrinas de la retina de vertebrados (Unger *et al.*, 1981;

Okamoto *et al.*, 1992). En algunas especies el VIP se colocaliza con GABA (Casini y Brecha, 1992), potenciando los efectos del GABA sobre las neuronas bipolares y ganglionares (Veruki y Yeh, 1992). En la retina de mamíferos, se ha detectado el mRNA codificante para otro de los péptidos de esta familia, el péptido activador de la adenilato ciclase (PACAP, Orianas *et al.*, 1997), así como para los receptores tipo I de este neuropéptido (Nilsson *et al.*, 1994; Orianas *et al.*, 1997).

En tortugas se ha localizado inmunorreactividad para el factor liberador de corticotropina (CRF) en dos poblaciones de células amacrinas. Todas estas células inmunorreactivas para CRF también contienen GABA (Zhang y Eldred, 1992).

Estudios inmunohistoquímicos han descrito la presencia de colecistocinina en células bipolares de primates (Wässle *et al.*, 1994; Kouyama y Marshak, 1992), células ganglionares desplazadas de aves (Britto y Hamassaki-Britto, 1993) y células amacrinas de anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Osborne *et al.*, 1982; Britto y Hamassaki-Britto, 1993).

## **2.6. SEROTONINA**

Las técnicas inmunohistoquímicas han permitido que los estudios anatómicos del sistema serotoninérgico en la retina de los vertebrados se encuentren muy avanzados (Osborne, 1984). En una revisión que incluye todas las clases de vertebrados se demuestra que la mayoría de las retinas contienen al menos un tipo de células amacrinas que es serotoninérgica (Ehinger, 1982). Estas células no son en general muy abundantes aunque tienen muchas ramificaciones constituyendo una parte importante de la IPL.

Estudios posteriores han determinado que aunque existen numerosas diferencias interespecíficas en los detalles del sistema serotoninérgico, como los tipos de células marcadas y sus patrones de ramificación y conectividad, pueden proponerse varias generalizaciones. Primera, en todas las especies de vertebrados no mamíferos, al menos se ha encontrado una población de células amacrinas que contienen serotonina. Segundo, dichas células amacrinas son de tipo estratificado (mono o biestratificado). Finalmente, parece haber una transición filogenética en la distribución de las ramificaciones serotoninérgicas. En peces, estas ramificaciones se encuentran en la sublámina a o en la zona de contacto de las subláminas a/b de la IPL, en lagartos

y anfibios las ramificaciones serotoninérgicas se encuentran más concentradas en la sublámina b que en la a, mientras que en mamíferos se hallan exclusivamente en la sublámina b.

En anfibios, concretamente en *Xenopus laevis*, se ha encontrado inmunorreactividad para serotonina en dos clases de células amacrinas y una clase de bipolares. Las dos clases de células amacrinas difieren en su tamaño pero ambas se ramifican difusamente a través de la sublámina b, específicamente desde el estrato 3 al 5, de la IPL (Schutte y Witkovsky, 1990). En realidad, en todas las especies de vertebrados no mamíferos estudiadas, las supuestas células amacrinas serotoninérgicas cubren densamente la superficie retiniana. Es más, en aquellas especies de las que se tienen datos ultraestructurales, como los ciprínidos (Holmgren-Taylor, 1983; Marc *et al.*, 1988) y los urodelos (Watt y Wilson, 1990), parece que estas células serotoninérgicas son células interamacrinas grandes.

En *Xenopus laevis*, existe una subpoblación de células bipolares, cuyos terminales axónicos se ramifican en el estrato 1 de la IPL, que presentan inmunorreactividad para serotonina y son capaces de recapturar dicha indolamina (Schutte y Witkovsky, 1990). Estudios posteriores han demostrado que estas neuronas son inmunonegativas para anticuerpos frente a la fenilalanina hidroxilasa (PH) y a la triptófano hidroxilasa (TPH), por lo que se cree que carecen de esta última enzima característica de las neuronas serotoninérgicas (Zhu *et al.*, 1992). De este modo, en *Xenopus laevis*, al igual que en muchas especies de vertebrados (Wilhelm *et al.*, 1993), únicamente las células amacrinas grandes y una pequeña proporción de las células amacrinas pequeñas son capaces de sintetizar serotonina, siendo, por tanto, auténticas neuronas serotoninérgicas. El resto de las neuronas amacrinas pequeñas y todas las neuronas bipolares que muestran inmunorreactividad para serotonina únicamente serían capaces de acumular dicho neuromodulador pero no sintetizarlo. Finalmente, aunque en los urodelos se ha descrito que todas las neuronas que muestran inmunorreactividad para serotonina también contienen GABA (Watt, 1992), en *Xenopus laevis*, el GABA únicamente se encuentra en las neuronas capaces de acumular serotonina pero no en las que sintetizan dicho neurotransmisor (Zhu y Straznický, 1993).

El papel de la serotonina como neurotransmisor en la retina, sugerido por los estudios anatómicos, es confirmado por datos bioquímicos y farmacológicos que demuestran tanto la presencia de receptores para serotonina como el acoplamiento funcional de éstos con su efector.

Además, los fármacos serotoninérgicos alteran el patrón de funcionamiento de las células ganglionares. Prácticamente la totalidad de estos trabajos ha sido realizada en mamíferos, siendo los estudios en vertebrados no mamíferos prácticamente inexistentes. En poiquiloterms únicamente se ha descrito que la serotonina es capaz de modular la liberación de dopamina y noradrenalina en teleósteos (Kato *et al.*, 1982, 83; Jaffé *et al.*, 1987). Por tanto en este apartado nos basaremos en lo descrito para mamíferos.

Estudios de unión de ligando realizados en homogeneizados de retina de conejos y bóvidos han permitido encontrar 3 de los 7 subtipos de receptores de serotonina: 5HT<sub>1</sub>, 5HT<sub>2</sub> (Mitchell y Redburn, 1985) y 5HT<sub>3</sub> (Barnes *et al.*, 1991). Los estudios de acoplamiento de los receptores con su efector han demostrado que la serotonina modula la actividad adenilato ciclasa (AC) en la retina de conejo, sugiriéndose que dicha modulación se ejerce a través de un receptor 5HT<sub>1</sub> (Blazynski *et al.*, 1985). Posteriormente, se ha confirmado que la serotonina incrementa la actividad AC a través de un receptor 5HT<sub>1a</sub> (Osborne y Ghazi, 1991; Urbina *et al.*, 1996). Es más, estudios de fraccionamiento de la retina encuentran actividad AC sensible a serotonina tanto en la IPL como en la OPL, siendo los efectos de la serotonina más potentes sobre la AC localizada en la IPL (Blazynski *et al.*, 1985).

Otra serie de estudios realizados también en la retina de conejo, demuestran que la serotonina a través de un receptor 5HT<sub>2</sub> estimula la hidrólisis de inosítoles fosfatos (Cutliffe y Osborne, 1987; Osborne y Ghazi, 1990).

## **2.7. DOPAMINA**

En todas las especies de vertebrados estudiados se ha descrito inmunorreactividad para tirosina hidroxilasa (TH, enzima limitante de flujo de la síntesis de catecolaminas) en una pequeña población de células amacrinas e interplexiformes (Nguyen-Legros, 1988; Dkhissi *et al.*, 1993; Wagner y Behrens, 1993; Witkovsky *et al.*, 1994). Su densidad varía en general entre 10 y 80 células por mm<sup>2</sup> y se encuentran repartidas por toda la superficie retiniana, aunque en algunas especies tienen cierta tendencia a concentrarse en la retina central (Oyster *et al.*, 1985). En la retina de *Xenopus laevis* la presencia de neuronas dopaminérgicas ha sido ampliamente demostrada, habiéndose localizado subpoblaciones de células amacrinas e interplexiformes que muestran inmunorreactividad frente a TH y sistemas de recaptura específicos para este

neuromodulador (Witkovsky *et al.*, 1993). Además, Las retinas de este anfibio *in vitro* son capaces de liberar dopamina (Boatright *et al.*, 1989). En reptiles, aves y mamíferos, una subpoblación abundante de las neuronas dopaminérgicas también contienen GABA, pero no en peces y anfibios (Wulle y Wagner, 1990).

Morfológicamente, en la mayoría de los vertebrados los árboles dendríticos de las neuronas dopaminérgicas adyacentes se solapan dando lugar a un plexo más o menos uniforme de finas fibras que se localiza en sublámina 1 de la IPL con escasas o ninguna ramificación en la OPL (Brunken *et al.*, 1986; Watt *et al.*, 1988; Schutte y Witkovsky, 1991; Engbretson y Battelle, 1987; Witkovsky *et al.*, 1994; Tauchi *et al.*, 1990; Oyster *et al.*, 1985). Sin embargo, en los teleosteos, la ramificación de las células interplexiformes se produce mayoritariamente en la OPL (Kalloniatis y Marc, 1990) y en primates tiene lugar tanto en la IPL como en la OPL (Ehinger, 1982). Así mismo, las neuronas dopaminérgicas tienen terminales dendríticos que penetran hasta los estratos 4 y 5 de la IPL y posteriormente ascienden para ramificarse entre el estrato 1 y 3. Los plexos dopaminérgicos del estrato 1 constituyen anillos que rodean los cuerpos celulares de otros tipos de células amacrinas (Törk y Stone, 1979; Schutte y Witkovsky, 1991).

Esta distribución anatómica tiene un significado funcional. De este modo, los terminales que se sitúan en los estratos 1 ó 2 van a sinaptar con células bipolares OFF mientras que los que se ramifican en el estrato 3 lo harán con neuronas bipolares ON (Famiglietti y Kolb, 1976; Nelson *et al.*, 1978; Saito, 1983). En peces (Yazulla y Zucker, 1988) y anfibios (Hanani y Vallergera 1980; Witkovsky *et al.*, 1994), las neuronas dopaminérgicas reciben información de células bipolares de la vía de los conos y de los bastones, y de células amacrinas que son positivas para FRMRamida (Zucker y Dowling, 1987). En reptiles, concretamente en tortugas, las neuronas dopaminérgicas reciben un 21% de la información de células bipolares y un 79% de células amacrinas (Pollard y Eldred, 1990). En mamíferos, las neuronas dopaminérgicas reciben información únicamente de células bipolares de la vía de los conos y de células amacrinas (Hokoc y Mariani, 1988)

Por otro lado, las neuronas dopaminérgicas van a sinaptar sobre células horizontales y una subpoblación no determinada de células amacrinas en teleosteos (Dowling y Ehinger, 1975) y sobre células GABAérgicas en la retina del gato (Kolb *et al.*, 1990). Además de estas sinapsis

químicas típicas, en otras especies se ha descrito que la dopamina puede actuar como un neurotransmisor difusible en la retina (Witkovsky y Schutte, 1991). De este modo, la existencia de sinapsis sobre los fotorreceptores no ha sido todavía establecida aunque los efectos de la dopamina sobre dichas células han sido ampliamente descritos (Iuvone y Alonso-Gómez, 1997b).

Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la familia de receptores de 7 fragmentos transmembranales que están acoplados a proteínas G (Gingrich y Caron, 1993). En la actualidad se han clonado 5 subtipos que se clasifican en 2 grandes familias atendiendo a su farmacología:  $D_1$  y  $D_2$ . La familia de receptores  $D_1$  engloba a los subtipos  $D_1$  (ó  $D_{1A}$ ),  $D_5$  (ó  $D_{1B}$ ),  $D_{1C}$  y  $D_{1D}$  que se encuentran normalmente acoplados positivamente a la actividad AC a través de una proteína  $G_s$  (Clements-Cornier *et al.*, 1975; Miller y Kelly, 1975; Dearry *et al.*, 1990a). Sin embargo, en algunas ocasiones muestran una heterogeneidad funcional. Por ejemplo, en la amígdala los receptores  $D_1$  suelen estar acoplados positivamente al sistema de inosítoles fosfatos (Undie y Friedman, 1990).

La familia de receptores  $D_2$  agrupa a los subtipos  $D_2$  propiamente dicho,  $D_3$  y  $D_4$ . Aunque tradicionalmente se pensaba que esta familia de receptores estaba únicamente acoplada negativamente a la AC (De Camili *et al.*, 1979; Enjalbert y Bockaert, 1983), actualmente se ha descrito que en muchos tipos celulares se produce una disminución de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Schofield, 1983), que no suele estar acoplado directamente a una inhibición en la tasa de recambio de los inosítoles fosfatos (Vallar y Meldolesi, 1989). Es más, en los melanóforos de la *pars intermedia* (Williams *et al.*, 1990) y en los fotorreceptores retinianos (Grant y Werblin, 1990) parece que los receptores con la farmacología típica  $D_2$  reducen la entrada de  $Ca^{2+}$  actuando directamente sobre los canales de  $Ca^{2+}$ . En la sustancia negra (Lacey *et al.*, 1987) y el estriado (Freedman y Weight, 1988) se ha descrito que los receptores con farmacología  $D_2$  pueden aumentar la conductancia de los canales de  $K^+$ , hiperpolarizando la célula e indirectamente cerrando los canales de  $Ca^{2+}$ .

En la retina, a partir de los estudios de unión de ligandos se han descrito ambos tipos de receptores. Los receptores  $D_1$ , caracterizados por su unión al antagonista selectivo [ $^3H$ ]-SCH 23390 o su análogo [ $^{125}I$ ]-SCH 23982, muestran una  $K_d$  entre 0,2 y 1 nM y una  $B_{max}$  de 50-250 fmol/mg prot. (Makman y Dvorkin, 1986; Agui *et al.*, 1988; De Keyser *et al.*, 1988).

Los receptores  $D_2$ , utilizando el antagonista [ $^3H$ ]-espiperona, muestran una mayor variación de su  $K_d$  (0,1-1,4 nM) y  $B_{max}$  (10-1600 fmo/mg prot.) (Redburn *et al.*, 1980; Makman *et al.*, 1980; McGonigle *et al.*, 1988). Estas diferencias en las constantes pueden deberse a la existencia de distintos subtipos de receptores de la familia  $D_2$ . Estudios de autorradiografía e inmunohistoquímica localizan receptores  $D_2$  en los segmentos internos de fotorreceptores (Brann y Young, 1986; Zarbin *et al.*, 1986; Dickman y Tran, 1990), en la OPL, IPL y GCL (Rohrer y Stell, 1995) y en las células de Müller (Biedermann, 1995). Así mismo, estudios de hibridación *in situ* localizan mRNA del receptor  $D_4$  en la capa nuclear externa de la retina de mamíferos (Cohen *et al.*, 1992) y de aves (Rohrer y Stell, 1995). Los receptores  $D_1$  se encuentran igualmente repartidos por la OPL y la IPL en todas las clases de vertebrados, excepto en teleósteos donde se localizan mayoritariamente en la OPL (Behrens y Wagner, 1995; Veruki y Wassle, 1996; Firth *et al.*, 1997; Nguyen-Legros *et al.*, 1997).

Las funciones de la dopamina en la retina son múltiples. En los vertebrados no mamíferos, la dopamina estimula los movimientos retinomotores de los fotorreceptores y las células del epitelio pigmentado causados por la luz (Besharse *et al.*, 1988; Hillman *et al.*, 1995). Además, en todas las especies de vertebrados estudiadas, la dopamina interviene en el recambio de los discos del segmento externo del fotorreceptor por el epitelio pigmentado (Besharse y Dunis, 1983; Besharse *et al.*, 1984; Masri *et al.*, 1996). Mientras que los efectos de la dopamina sobre los fotorreceptores están siempre mediados por receptores de la familia  $D_2$ , los receptores implicados en la regulación de las células del epitelio pigmentado varían dependiendo de la especie. De este modo, se ha descrito que los receptores implicados en los peces pertenecen a la familia  $D_2$  (Dearry y Burnside, 1986, 1988) mientras que en el resto de los vertebrados son de la familia  $D_1$  (Dearry *et al.*, 1990b; Masri *et al.*, 1996). Otra de las funciones importantes que la dopamina está ejerciendo sobre los fotorreceptores es la regulación de la síntesis de melatonina de la cual se tratará más detalladamente en el apartado 3.2 de esta introducción.

La dopamina también está interviniendo en dos funciones de las células horizontales. Por un lado, la dopamina induce una marcada reducción de la difusión de colorantes vitales a través de uniones gap en peces (Laufer, 1982; McMahon y Mattson, 1996) y reptiles (Geirschenfeld *et al.*, 1982) estando dicha acción mediada a través de receptores de la familia  $D_1$  (Lasarte y Dowling, 1985; De Vries y Schwartz, 1989). En la cascada de transmisión de esta señal

intervienen el cAMP, H<sup>+</sup> y el Ca<sup>2+</sup>. El cAMP y H<sup>+</sup> provocan cambios en la resistencia de estas uniones, mientras que el calcio actúa como un modulador modificando la resistencia de la membrana plasmática (Laufer y Salas, 1993). Por otro lado, la dopamina, también a través de receptores D<sub>1</sub>, regula positivamente la frecuencia y el tiempo medio de apertura de los canales de glutamato de las células horizontales acopladas a la vía de los conos (Knapp y Dowling, 1987; Knapp *et al.*, 1990). Los efectos de la dopamina sobre los canales de glutamato están mediados por la PKA pero no por la PKC (Schmidt, 1995). La dopamina también puede reducir la liberación de GABA por el soma y dendritas de las células horizontales aunque no afecta a la liberación axonal de este neurotransmisor (Yazulla y Kleinschmidt, 1982).

## 2.8. ADENOSINA

La adenosina se encuentra en todas las células, ya que es un producto intermediario del metabolismo energético. Los niveles basales de adenosina intracelular se regulan principalmente por la acción de varias enzimas: 1) adenosina quinasa, que fosforila la adenosina formando AMP, 2) adenosina desaminasa (ADA), que desamina la adenosina formando inosina. Dependiendo del tipo celular, predominan la fosforilación o la desaminación. Cuando las neuronas se activan, la elevación de los niveles de adenosina intracelular se produce mayoritariamente al hidrolizarse el ATP a AMP que posteriormente se desfosforilará por una 5'-nucleotidasa para formar adenosina (Philips y Newsholme, 1979; Nagata *et al.*, 1984). Otras posibles rutas minoritarias de formación de la adenosina son la hidrólisis de la S-adenosilhomocisteína, la reacción de adenina y ribosa y la degradación del 3'-AMP. Otro sistema importante de regulación de los niveles intracelulares de adenosina es el transporte a través de la membrana plasmática. Dicho transporte se lleva a cabo por una permeasa de nucleósidos simétrica (Plagemann y Wohlueter, 1983). La dirección del transporte depende únicamente de los niveles de adenosina a ambos lados de la membrana.

Cuando se realizan estudios de autorradiografía localizando el marcaje de sitios de recaptura de adenosina encontramos que sólo unas pocas subpoblaciones celulares de la retina se marcan, indicando las posibles células con actividad adenosinérgica. En todas las especies estudiadas, los cuerpos celulares grandes y los somas pequeños de las células ganglionares localizados cerca de la IPL acumulan adenosina radiactiva (Goodman *et al.* 1983; Geiger, 1986). Así mismo, los fotorreceptores, las células horizontales de la capa distal 3 de la INL (Ehinger y

Pérez, 1984; Pérez and Brunn, 1987; Studholme y Yazulla, 1997) y algunas células de Müller (Ehinger y Pérez, 1984) también presentan una fuerte recaptura de adenosina radiactiva .

Estudios de autorradiografía utilizando un anticuerpo contra ácido levulínico, que es altamente específico para adenosina, localizan inmunorreactividad para adenosina en los cuerpos celulares de la capa ganglionar y en la mitad interna de la INL de humanos, monos, conejos, cobayas, ratas, ratones y ardillas (Braas *et al.*, 1987; Blazynski *et al.*, 1989a y b). En todas las especies, la inmunorreactividad fue más fuerte en la GCL que en la INL. Así mismo, se ha detectado inmunorreactividad para adenosina en fotorreceptores embrionarios de pollo (Paes de Carvalho *et al.*, 1990) y en una subpoblación de fotorreceptores de humanos y monos (Braas *et al.*, 1987).

Hasta la fecha se han descrito 3 subtipos de receptores de adenosina  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$  que son receptores de membrana y generalmente se encuentran acoplados negativa ( $A_1$ ,  $A_3$ ) o positivamente ( $A_2$ ) a la AC (Van Calker *et al.*, 1979; Bruns *et al.*, 1980). Sin embargo, se han descrito algunas respuestas de ambos tipos de receptores de adenosina no acopladas a una variación de los niveles de cAMP (Michaelis *et al.*, 1988; Schubert, 1988; Rubio *et al.*, 1989). Los receptores  $A_1$  parecen estar asociados a la AC a través de una proteína  $G_i$  o  $G_o$ , ya que la unión del receptor  $A_1$  se modifica por GTP y sus efectos se bloquean por la toxina pertussis (Dolphin y Prestwich, 1985). En mamíferos, estudios autorradiográficos usando [ $^3$ H]R-PIA y [ $^3$ H]CHA localizan receptores  $A_1$  en la retina interna encontrándose la máxima densidad del marcaje en la IPL (Braas *et al.*, 1987; Blazynski, 1990). La utilización de [ $^3$ H] NECA ha permitido localizar los receptores  $A_2$  en el epitelio pigmentado y los segmentos interno y externo de fotorreceptores de mamíferos (Blazynski, 1990 y 1993; Blazynski y McIntosh, 1993).

Los trabajos sobre las funciones de la adenosina en la retina son escasos. Debido al carácter ubicuo de la adenosina es muy difícil el estudio de sus distintas acciones. En aves y mamíferos se ha descrito una liberación tónica y estimulada por despolarización de purinas, siendo los derivados adenosinérgicos los productos mayoritarios (Pérez *et al.*, 1986; Paes de Carvalho *et al.*, 1990). Cuando se añade un inhibidor de la ADA aumenta el porcentaje de adenosina detectado, indicando que parte de la adenosina liberada se degrada rápidamente en el espacio extracelular. Así mismo, la liberación de adenosina aumenta en presencia de glutamato

mediándose los efectos por receptores NMDA (Pérez y Ehinger, 1989). La acetilcolina también parece estimular la liberación de adenosina (Watkins y Evans, 1981), mientras que el GABA, la glicina y la dopamina la inhibirían (Pérez y Ehinger, 1989). En la liberación de adenosina parecen intervenir tanto mecanismos dependientes como independientes de calcio (Pérez *et al.*, 1988). Entre las funciones de la adenosina en la retina se encuentran acciones mediadas por receptores  $A_1$ , como la inhibición de la liberación de acetilcolina (Pérez y Ehinger, 1990) y dopamina (Crosson *et al.*, 1994) y el aumento de amplitud de la onda b del ERG (Blazynski *et al.*, 1989a; Früh *et al.*, 1989), y por receptores  $A_2$  como la estimulación de la hidrólisis del glucógeno (Osborne, 1989) y el aumento del flujo sanguíneo ocular causado por vasodilatación (Braunagel *et al.*, 1988; Campochiaro y Sen, 1989; Crosson *et al.*, 1994; Zhu y Gidday, 1996).

### 3. MELATONINA

La N-acetil-5-metoxitriptamina fue identificada por primera vez por Lerner y colaboradores (1958), en extractos de glándula pineal de bóvidos y se la denominó melatonina por su capacidad para agregar los melanóforos dérmicos de anuros. Actualmente, está ampliamente demostrado que la melatonina se sintetiza, además de en la glándula pineal, en la retina de todos los vertebrados estudiados, donde, aparte de su carácter hormonal, juega un importante papel como neuromodulador. En la glándula pineal, la melatonina tiene carácter únicamente hormonal. En la mayoría de los vertebrados y en ambos órganos, la síntesis y liberación de melatonina al sistema circulatorio ocurre con un ritmo diario con sus mayores niveles durante la fase oscura del fotoperíodo. La melatonina circulante es una señal hormonal del fotoperíodo que regula diaria y estacionalmente un gran número de ritmos endocrinos, neurales y de comportamiento (Amstrong, 1989; Bartness y Goldman, 1989; Cassone, 1990). En esta memoria nos centraremos únicamente en el papel neuromodulador de la melatonina en la retina.

La melatonina ejerce sus funciones a través de receptores de membrana de alta afinidad (Kd en el intervalo pM) que están acoplados a proteínas G (Nash y Osborne, 1995, Reppert *et al.*, 1996). Los receptores de melatonina se expresan en la retina de todos los vertebrados, incluido *Xenopus laevis* (Mazzucchelli *et al.*, 1996), localizándose en las INL, IPL y en el epitelio pigmentado (Laitinen y Saavedra, 1990; Blazynsky y Dubocovich, 1991; Chong y Sugden, 1991; Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1991; Nash y Osborne, 1995). Generalmente, los receptores de melatonina se acoplan negativamente a la AC (Iuvone y Gan, 1994, Iuvone *et al.*, 1995b, Nash

y Osborne, 1995) aunque en algunos casos se ha descrito una regulación de las corrientes de  $K^+$  y cambios en la concentración intracelular de calcio (Nelson *et al.*, 1996; Vanecek y Klein, 1995).

Las funciones de la melatonina en la retina son múltiples. La melatonina inhibe la liberación de dopamina y acetilcolina y estimula la liberación de glutamato (Dubocovich, 1983; Mitchell y Redburn, 1991; Boatright *et al.*, 1994; Faillace *et al.*, 1996). De hecho, en *Xenopus laevis* la liberación de dopamina se estimula por la luz (Boatright *et al.*, 1989) y la de glutamato por la oscuridad (Schmitz y Witkovky, 1996), por lo que la melatonina retiniana estaría mimetizando el efecto de la oscuridad. La melatonina también interviene en la activación del recambio y fagocitosis de los discos del segmento externo de los bastones (Besharse y Dunis, 1983; Besharse *et al.*, 1984). En muchas especies de vertebrados, incluido *Xenopus laevis*, ambos procesos son circadianos siendo la melatonina el intermediario de los efectos del reloj biológico en la retina. Así mismo, la melatonina induce los movimientos adaptativos a la oscuridad de conos y los movimientos retinomotores del epitelio pigmentado (Cheze y Ali, 1976; Pang y Yew, 1979; Pierce y Besharse, 1987; Stemkamp *et al.*, 1994). Finalmente, la administración de melatonina previamente a la exposición a alta iluminación aumenta la degeneración de los fotorreceptores inducida por la luz en ratas albinas (Bubenik y Purtill, 1980; Leino *et al.*, 1984; Wiechmann y O'Steen, 1992). Aunque se desconoce el mecanismo por el que se lleva a cabo este proceso, los datos actuales sugieren que la responsable sería la inhibición de la liberación de dopamina con la consiguiente pérdida del efecto protector de este neurotransmisor frente a la iluminación intensa (Iuvone, 1996).

### **3.1. RUTA DE SÍNTESIS**

La ruta biosintética de melatonina es común en la glándula pineal y la retina y tiene lugar a partir del aminoácido triptófano por la acción secuencial de 4 enzimas (mostradas en el Esquema 1) de las cuales las 2 primeras son comunes a la síntesis de serotonina.

En la retina, la producción de melatonina parece ocurrir únicamente en los fotorreceptores. En aves, sólo se ha localizado mRNA de la HIOMT en células fotorreceptoras (Wiechman y Craft, 1993; Guerlotté *et al.* 1996; Wiechman, 1996) y la actividad específica NAT es mayor en cultivos celulares enriquecidos en fotorreceptores que en retinas intactas (Iuvone *et al.*, 1990). Además, en *Xenopus laevis* únicamente se ha detectado hibridación *in situ* para la TPH

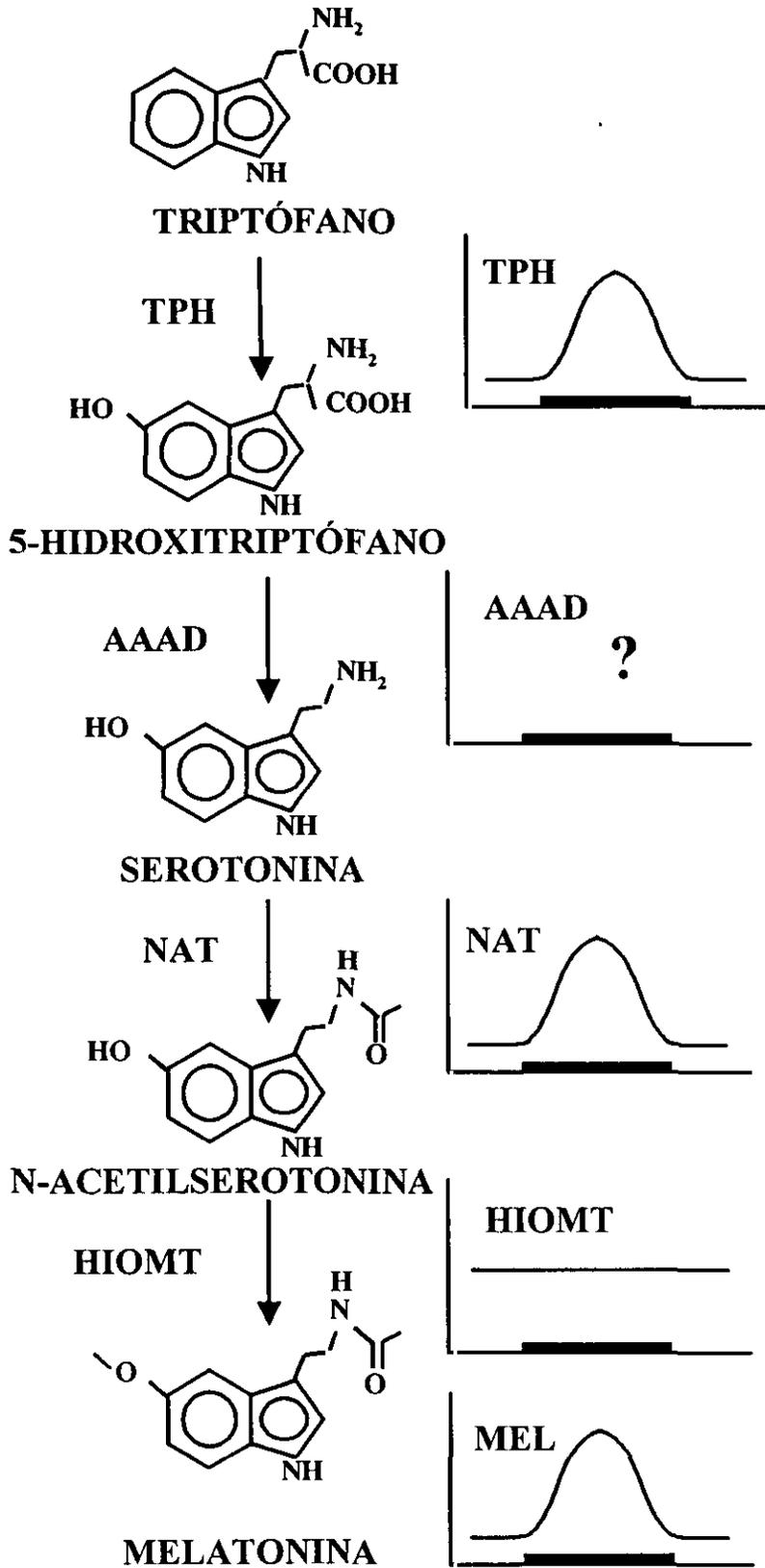
en los fotorreceptores (Green *et al.*, 1995) y la liberación de melatonina no se modifica después de la destrucción de la retina interna por lisis con detergentes (Cahill y Besharse, 1992). Finalmente, en cultivos celulares de retinoblastoma humano, las células que se diferencian en fotorreceptores *in vitro* expresan la actividad NAT y producen melatonina (Janavs *et al.*, 1991).

#### a) Triptófano hidroxilasa

La melatonina se sintetiza a partir del L-triptófano (L-Trp), que es captado de la circulación sanguínea por transporte activo (Redburn y Mitchell, 1989). La triptófano hidroxilasa (TPH, E.C. 1.14.16.4) es la primera enzima de la ruta y convierte el triptófano en 5-hidroxitriptófano (5OHTrp). La TPH pertenece a la familia de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos a la que también pertenecen las actividades fenilalanina hidroxilasa (PH; E.C. 1.14.16.1) y TH (E.C. 1.14.16.2). La reacción de hidroxilación catalizada por las 3 enzimas va a utilizar oxígeno molecular como sustrato y requiere como cofactor la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) que se oxidará durante la reacción generando dihidrobiopterina.

Trabajos recientes sugieren a la actividad TPH como una actividad limitante de flujo en la producción de melatonina. En este sentido, se ha descrito que los niveles de melatonina en la retina (Cahill y Besharse, 1990) y en plasma (Radwing y Hutchison, 1992) de anfibios, en la glándula pineal de bóvidos (Namboodiri *et al.*, 1983) y en células humanas de retinoblastoma (Pierce *et al.*, 1989) se encuentran limitados por la serotonina disponible.

Actualmente, se ha descrito la secuencia del cDNA de la TPH en 7 especies distintas (Grennet *et al.*, 1987; Darmon *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1991; Florez *et al.*, 1996; Boularand *et al.*, 1990; Tipper *et al.*, 1994; Stoll *et al.*, 1990; Green y Besharse, 1994). La secuencia del cDNA de la TPH de estas especies presentan un alto grado de homología entre sí, así como con los cDNA descritos para la TH y la PH. Concretamente el cDNA de la TPH retiniana de *Xenopus laevis* es una secuencia de 1452 bp que se transcribe en un mRNA de 3.8 Kb y codifica para una proteína de 418 aminoácidos (Esquema 2). La secuencia supuesta de aminoácidos para el cDNA de la TPH de *Xenopus laevis* contiene 9 cisteínas conservadas, de las que 5 se encuentran en el dominio catalítico de las otras hidroxilasas de aminoácidos aromáticos (○), y las otras 4 cisteínas (●) se conservan únicamente entre las secuencias de la TPH de todos los vertebrados. Así mismo, también contiene 2 serinas conservadas en posición 95 y 298 propuestas como sitios de



**Esquema 1:** Ruta de síntesis de melatonina. En las gráficas de la derecha se representa el perfil del ciclo diario de la actividad de las enzimas de la ruta y el contenido de melatonina de la retina.

fosforilación por la proteína quinasa A (PKA; Kuhn *et al.*, 1997; ■) y la proteína quinasa dependiente del complejo calcio-calmodulina (CaMKII; Darmon *et al.*, 1988; □), respectivamente. La diferencia principal entre el gen de la TPH de *Xenopus laevis* y el de otras especies, es que posee 37 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal que no se han descrito para ninguna otra especie.

Los estudios de delección sugieren que la TPH, al igual que la TH y la PH, posee un dominio regulador coincidiendo con los primeros 100 aminoácidos del extremo N-terminal y un dominio catalítico en el extremo C-terminal (Grenett *et al.*, 1987; Yang y Kaufman, 1994). El dominio catalítico de la TPH muestra una alta homología con el dominio catalítico de la TH (60%) mientras que existe una homología muy baja entre sus dominios reguladores (11%). Por tanto, se pensaba que la especificidad por el sustrato de ambas enzimas se localizaba en su dominio regulador. Sin embargo, estudios recientes con quimeras moleculares demuestran que la especificidad por el L-Trp de la TPH se localiza en el dominio catalítico (Mockus *et al.*, 1997a). Así mismo, el análisis de la secuencia de aminoácidos de la TPH demuestra la existencia de regiones altamente conservadas entre las distintas especies y con la TH que formarían cremalleras de leucina (Liu y Vrana, 1991; Yang y Kaufman, 1994) y serían las responsables de la estructura tetramérica de estas enzimas (Tong y Kaufman, 1975; Markey *et al.*, 1980; Nagatsu y Ichinose, 1991; Nakata y Fujisawwa, 1982). De hecho, un trabajo reciente demuestra que el dominio catalítico de la TPH contiene un dominio de unión que es esencial para la formación del tetrámero (Mockus *et al.*, 1997b).

Los estudios sobre los mecanismos que regulan la actividad TPH son escasos debido a la gran labilidad e inestabilidad de la enzima. Se ha descrito que la actividad TPH se puede regular por factores ambientales, como el fotoperiodo, y por mecanismos de fosforilación. La regulación por la luz de la actividad TPH de la glándula pineal ha sido ampliamente estudiada, encontrándose en todas las especies un ritmo diario de actividad con sus mayores valores durante la fase oscura del fotociclo (Shibuya *et al.*, 1978; Sitaram y Lees, 1978; Erhet *et al.*, 1991). En la retina, únicamente se ha descrito un ritmo diario de actividad TPH en el pollo, que coincide con el ritmo de producción de melatonina y con la característica de que ambos ritmos son circadianos (Thomas y Iuvone, 1991). Aunque en anfibios no hay ningún trabajo sobre las características de la actividad TPH retiniana, en *Xenopus laevis* se ha descrito que el mRNA de la TPH presenta un

**SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA TRIPTÓFANO HYDROXILASA**

	-37			1		23
Humano	-----	-----	-----	-----MIE	D---NKENKD	HSLERGRASL
Ratón	-----	-----	-----	-----MIE	DNKENKENKD	HSSERGRVTL
Pollo	-----	-----	-----	-----MIE	DNKENKENKD	HAPERGRTAI
Xenopus	MYSNRKECPR	RVKSFDSVNS	GLDENQINNE	FNKSTYIKIE	DNKENKEYSE	NVCER GKASV
				<b>PKA</b>		
				■	●	83
Humano	IFSLKNEVGG	KIKALKIFQE	KHVNLIHIES	RKSKRRNSEF	EIFVDCDINR	EQLNDIFHLL
Ratón	IFSLENEVGG	LIKVLKIFQE	NHVELIHIES	RKSKQRNSEF	EIFVDCDISR	EQLNDIFPLL
Pollo	IFSLKNEVGG	LVKALKLFQE	KHVNLVHIES	RKSKARNSEF	EOFVDCDSNR	EQLNEIFQLL
Xenopus	IFSLKNEVGG	LVKALKIFQE	KHVNLIHIES	RKSLRRNSEF	EIFVDCDSNR	EQLNEIFQLL
				●		143
Humano	KSHTNVLSVN	LPDNFTLKED	G-METVPWFP	KKISDLDHCA	NRVLMYGSEL	DADHPGFKDN
Ratón	KGHATVLSVD	SPDQLTAKED	V-METVPWFP	KKISDLDFCA	NRVLLYSEL	DADHPGFKDN
Pollo	KSHSVIVSMN	PTEHFNVQED	GDMENIPWYP	KKLSDLDKCA	NRVLMYGSDL	DADHPGFKDN
Xenopus	KRHVNVISMS	PPENFTVCED	-DMESVPWFP	KKISDLDKCA	NRVLMYGSEL	DADHPGFKDN
						○ 203
Humano	VYPKRRKYFA	DIAMNYKHGD	PIPKVEFTEE	EIKTWGTVFQ	ELNKLYPTHA	CRETLKBPL
Ratón	VYPRRRKYFA	EIAMNYKHGD	PIPKIEFTEE	EILTWGTOFR	ELNKLYPTHA	CREYLRNLPL
Pollo	VYPKRRKYFA	DIAMNYKHGD	PIPEIEFTEE	EIKTWGTVYR	ELNKLYPTHA	CREYLRNLPL
Xenopus	VYPKRRKYFA	DVAMSYYKGD	PIPHIEFTEE	EIQTWGTVFR	ELNKLYPTHA	CREYLRNLPL
	○					○ 263
Humano	LSKYCGYRED	NIPQLEDVSN	FLKERTGFSI	RPVAGYLSPR	DFLSGLAFRV	FHCTQYVRHS
Ratón	LSKYCGYRED	NIPQLEDVSN	FLKERTGFSI	RPVAGYLSPR	DFLSGLAFRV	FHCTQYVRHS
Pollo	LIKYCGYRED	NIPQLEDVSR	FLKERTGFII	RPVAGYLSPR	DFLAGLAFRV	FHCTQYVRHS
Xenopus	LSKHCGYRED	NIPQLEDVSR	FLRERTGFII	RPVAGYLSPR	DFLAGLAFRV	FHCTQYVRHD
	<b>PKC</b>					● 313
	□	○				
Humano	SDPFYTPEPD	TCHHELLGHVP	LLAEPSFAQF	SQEUGKASKG	ASEEAVQJKA	TCYFFTVEFG
Ratón	SDPLYTPEPD	TCHHELLGHVP	LLAEPSFAQF	SQEUGKASKG	ASEEIVQKLA	TCYFFTVEFG
Pollo	SDPLYTPEPD	TCHHELLGHVP	LLAEPSFAQF	SQEUGKASKG	ASDEAVQKLA	TCYFFTVEFG
Xenopus	SDPLNTPEPD	TCHHELLGHVP	LLAEPSFAQF	SQEUGKASKG	ASDEAVQKLA	TCYFFTVEFG
	○				●	373
Humano	LCKQDGQLRV	FGAGLLSSIS	ELKHALSGHA	KVKPFDPKIT	CKQECLITTF	QDVYFVSESF
Ratón	LCKQDGQLRV	FGAGLLSSIS	ELKHALSGHA	KVKPFDPKIA	CKQECLITSF	QDVYFVSESF
Pollo	LCKQEGCLRV	YGAGLLSSIS	ELKHSLSGSA	KVKPFDPKVT	CKQECLITTF	QEVYFVSESF
Xenopus	LCKQEGKLV	YGAGLLSSIS	ELKHSLSGNA	KVKPFDPMT	CNQECIITSF	QELYFVSESF
						433
Humano	EDAKEKMREF	IKTIKRPFGV	KYNPYTRSIQ	ILKDTKSITS	AMNELQHDLD	VVSDALAKVS
Ratón	EDALELMREF	AKTVKRPFGV	KYNPYTQSVQ	VLRDTKSITS	AMNELRYDLD	VISDALARVT
Pollo	EFAKEKMREF	AKTIKRPFGV	KYNPYTQSVQ	ILKDTKSIAS	VVNELRHLD	IVSDALSKMG
Xenopus	EFAKEKMREF	AKTICRPFGV	KYNPFTOSVD	ILADTKSIAM	VVRELRLHLD	IVNDALNKMN
Humano	RKPSI	444				
Ratón	RWPSV	447				
Pollo	KQLEV	445				
Xenopus	KQLGV	481				

**Esquema 2:** Secuencia de aminoácidos de la proteína de la TPH en humanos (Boulard et al., 1990), ratón (Stoll et al., 1990), pollo (Florez et al., 1996) y *Xenopus laevis* (Green y Besharse, 1994). En la secuencia se indican los posibles residuos de fosforilación por la PKA (■) y la PKC (□), y las 5 Cys conservadas en todas las TPH (●) y comunes con la TH y PH (○).

perfil circadiano con su valor máximo al inicio de la fase oscura del fotociclo (Green *et al.*, 1995). Los trabajos sobre la regulación por neurotransmisores de la actividad TPH se han realizado fundamentalmente en cerebro siendo en su mayoría estudios *in vitro* que describen una estimulación de la actividad enzimática tras su fosforilación por la PKA (Johansen *et al.*, 1996) y la CaMPKII (Ehret *et al.*, 1989). Por lo que nosotros sabemos, no existe ningún trabajo acerca de la regulación endógena de la TPH en la retina.

#### **b) L-aminoácido aromático descarboxilasa.**

El 5-OHTrp es descarboxilado por la acción de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD; E.C. 4.1.1.28) rindiendo serotonina. Se ha demostrado su existencia en los ojos de *Xenopus laevis* (Baker, 1966). Existen muy pocos estudios acerca de la posible ritmicidad diaria de esta enzima aunque todos parecen indicar que dicha ritmicidad no tiene lugar, no obstante la realización de trabajos adicionales al respecto parece necesaria para dilucidar esta cuestión en la retina. Debido a la presencia de la AAAD en las neuronas dopaminérgicas, para la realización de dichos estudios se requiere la utilización de neurotóxicos específicos frente a las neuronas dopaminérgicas.

#### **c) Arilalquilamina-N-acetiltransferasa.**

La acetilación de la serotonina en su extremo N-terminal es catalizada por la enzima Arilalquilamina-N-acetiltransferasa, también denominada serotonina N-acetiltransferasa (NAT; E.C. 2.3.1.5). La NAT es considerada como otra de las enzimas limitantes de flujo de la síntesis de melatonina, ya que ha sido ampliamente comprobada la existencia de una variación diaria en los niveles de esta enzima en concordancia con los cambios observados de la melatonina (Klein y Weller, 1970; Hamm y Menaker, 1980; Besharse y Iuvone, 1983; Olcese y Moller, 1989).

Al igual que para la TPH, el gen de la NAT se ha clonado recientemente en tres clases de vertebrados, peces (Klein *et al.*, 1997), aves (Bernard *et al.*, 1997a) y mamíferos (Coon *et al.*, 1995, 1996; Rosenboom *et al.*, 1996), no habiéndose descrito todavía para ninguna especie de anfibio. La secuencia del cDNA de la NAT para todas estas especies conserva un alto grado de homología pero no se parece a la de ninguna otra proteína descrita (Klein *et al.*, 1997). La secuencia del cDNA de la NAT únicamente tiene cierta similitud en los dominios a y b con la

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA NAT

	1		PKA	CK2	CK2	60
Humano	MSTQSTHPLK	PEAPRLPPGI	PESPCQRRH	TLPASEFRCL	<b>TPEDAVSAFE</b>	IHEREAFISVL
Mono	MSTQSTHPPK	PEAPRLPPAI	S...SCQRRH	TLPASEFRCL	<b>TPEDAVSAFE</b>	IHEREAFISVL
Oveja	MSTPSVHCLK	PSPLHLPSGI	PGSPGRQRRH	TLPANEFRCL	<b>TPEDAAGVFE</b>	IHEREAFISVS
Rata	..MLSIHPLK	PEALHLPLGT	SEFLGCQRRH	TLPASEFRCL	<b>TPEDATSAFE</b>	IHEREAFISVS
Pollo	MPVLGAVPFLK	PTPLQGPRNS	P...GRQRRH	TLPASEFRCL	<b>SPEDAVSVFE</b>	IHEREAFISVS
Trucha	.....	.....	.....	.....	.....	.....FVSVS
Esturión	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consenso	-----K	P-----P---	-----QRRH	TLPA-EFRCL	-PEDA---FE	IHEREAFISV-
				CK2		120
Humano	GVCPLYLDEI	RHFLTLCPEL	SLGWFEEGCL	VAFIIGSLWD	KERLMQESLT	LHRSGGHIAH
Mono	GVCPLYLDEI	RHFLTLCPEL	SLGWFEEGCL	VAFIIGSLWD	KDRLMQESLT	HHRPGGHIAH
Oveja	GNCPLNLDEV	QHFLTLCPEL	SLGWFEVGR	VAFIIGSLWD	SERLTQESLA	LHRPRGHSAAH
Rata	GTCPLHLDEI	RHFLTLCPEL	SLGWFEEGCL	VAFIIGSLWD	KERLTQESLT	LHRPGGRTAH
Pollo	GDCPLHLDEI	RHFLTLCPEL	SLGWFEEGRL	VAFIIGSLWD	QDRLSQAALT	QHIPETSAAVH
Trucha	GECPLTLDEV	LNFLSQCPPEL	SLGWFEEGQL	VAFIIGSGWG	KERLEQEAMT	QHIPETSAAVH
Esturión	.....	.....	.....	.....LWD	QEKLTMALT	LHKPHBSTVH
Consenso	G-CPL-LDE-	-HFLTLCPEL	SLGWFEEG-L	VAFIIGSLWD	-ERL-QE-LT	LH-P-G---H
		<b>PKC</b>				180
Humano	<b>IHVLAHVRAF</b>	<b>RQQGRGPILL</b>	WRYLHHLGSQ	PAVRRALMC	EDALVPFYER	<b>FSFHAVGPCA</b>
Hono	<b>LHVLAVHCAF</b>	<b>RQQGRGPILL</b>	WRYLHHLGSQ	PAVHRAALMC	EDALVPFYER	<b>FGFHAMGPCA</b>
Oveja	<b>LHALAVHRSF</b>	<b>RQQKGKSVLL</b>	WRYLHHVGAQ	PAVRRAVLMC	EDALVPFYGR	<b>FGFHPAGPCA</b>
Rata	<b>LHVLAHVRTF</b>	<b>RQQKGKSVLL</b>	WRYLHHLGSQ	PAVRRAVLMC	ENALVPFYEK	<b>FGFQAMGPCA</b>
Pollo	<b>IHVLAHVRTF</b>	<b>RQQKGKSILM</b>	WRYLQYLRCL	PCARPAVLMC	EDFLVPFUEL	<b>CGFVAVGPCQ</b>
Trucha	<b>IHVLSVHRHA</b>	<b>RQQKGKSILL</b>	W.....	.....	.....	.....
Esturión	<b>IHVLAHVRTF</b>	<b>RQQKGKSILH</b>	WRYLQYLRCL	PYVRR....	.....	.....
Consenso	<b>-HVLAVHR-F</b>	<b>ROQKGSILL</b>	WRYL--L---	P-VVRA-LMC	E--LVPFY--	<b>--F---GPC-</b>
		DOMINIO A			DOMINIO B	
	CK2	PKC	PKA	208		
Humano	ITVGS <b>LT</b> FME	LHCSLG <b>GH</b> PF	LRRNSGC			
Mono	ITVGS <b>LS</b> FTE	LHCSL <b>Q</b> GHPF	LRRNSGC			
Oveja	IVVGS <b>LT</b> FTE	MHCSL <b>R</b> GHAA	LRRNSDR			
Rata	ITMGS <b>LT</b> FTE	LQCSL <b>R</b> CHTF	LRRNSGR			
Pollo	VTVG <b>T</b> LAFTE	MQHEV <b>R</b> GHAF	MRRNSGC			
Trucha	.....	.....	.....			
Esturión	.....	.....	.....			
Consenso	---G-L-F-E	-----H--	-RRNS--			

**Esquema 3:** Secuencia de aminoácidos de la NAT de humanos, mono, oveja, rata, pollo, trucha y esturión (Klein *et al.*, 1997). En la secuencia se muestran en negrita los posible residuos de fosforilación por las proteínas quinasas indicadas, así como los dominios A y B. CK2: Caseína quinasas 2.

secuencia del cDNA de una pequeña familia de acetiltransferasas y con una hipotética proteína de levaduras, YD8554 (Coon *et al.*, 1995). Por tanto, se piensa que en los dominios A y B residiría el sitio de unión para el cosustrato Acetil-CoA. El tamaño del cDNA de la NAT varía dependiendo de la especie entre 1,9 y 3,8 Kb, y posee 3 intrones y 5 exones. Este cDNA se transcribe en un mRNA comprendido entre 1 y 1,7 Kb que codifica para una proteína de aproximadamente unos 23 KDa (peso determinado a partir de su secuencia hipotética; Esquema 3) y cuyo punto isoeléctrico varía entre 7,3 y 8,2 en función de la especie. El mRNA de la NAT se ha localizado principalmente en la glándula pineal y la retina, aunque en mamíferos también se encuentra en unos niveles muy bajos en el testículo, la hipófisis y determinadas áreas cerebrales (Borjigin *et al.*, 1995; Coon *et al.*, 1995, 1996; Rosenboom *et al.*, 1996). En la retina, el mRNA de la NAT se localiza mayoritariamente en los fotorreceptores (Coon *et al.*, 1996; Bernard *et al.*, 1997a). Entre las distintas regiones conservadas en la secuencia para la proteína de la NAT de las distintas especies cabe destacar: los dominios A y B, sitios de fosforilación por la PKA tanto en la región N- como C-terminal, 5 cisteínas que podrían estar interviniendo en los mecanismos de inactivación por intercambio de grupos tiol:disulfuro (Namboodiri *et al.* 1980, 1881) y en la catálisis (Andres *et al.*, 1988), un grupo de histidinas situadas en el centro de la molécula y a las que se les ha atribuido funciones catalíticas (Klein y Kirk, 1976; Klein *et al.*, 1997) y estructurales (Rees *et al.*, 1983) y por último, una región en el extremo N-terminal que posee 3 péptidos altamente conservados que, por su carácter altamente hidrofóbico, se supone que pueden ser la región donde reside la especificidad por el sustrato arilalquilamina (Klein *et al.*, 1997).

#### **d) Hidroxindol-O-metiltransferasa.**

El último paso de la síntesis de melatonina está catalizado por la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT; E.C. 2.1.1.4). Consiste en la metilación del grupo hidroxilo en posición 5 del anillo indólico. La enzima utiliza como cofactor la S-adenosín-metionina (Zawilska y Nowak, 1992). En la retina, estudios de hibridación *in situ* han localizado el mRNA y la proteína de la HIOMT únicamente en una subpoblación de fotorreceptores (Guerlotté *et al.*, 1996; Wiechmann, 1996). En ninguna de las especies estudiadas se ha encontrado un ritmo diario de actividad HIOMT en la retina, encontrándose una oscilación diaria de los niveles de ésta enzima muy pequeña en la glándula pineal (Quay 1965; Cardinali y Rosner, 1971; Eirchler y Moore, 1975; Wainwright 1979; Gern *et al.*, 1984; Nowak *et al.*, 1993). Sin embargo, en ambos órganos de aves y mamíferos se ha descrito un ritmo diario de los valores del mRNA de la HIOMT. En

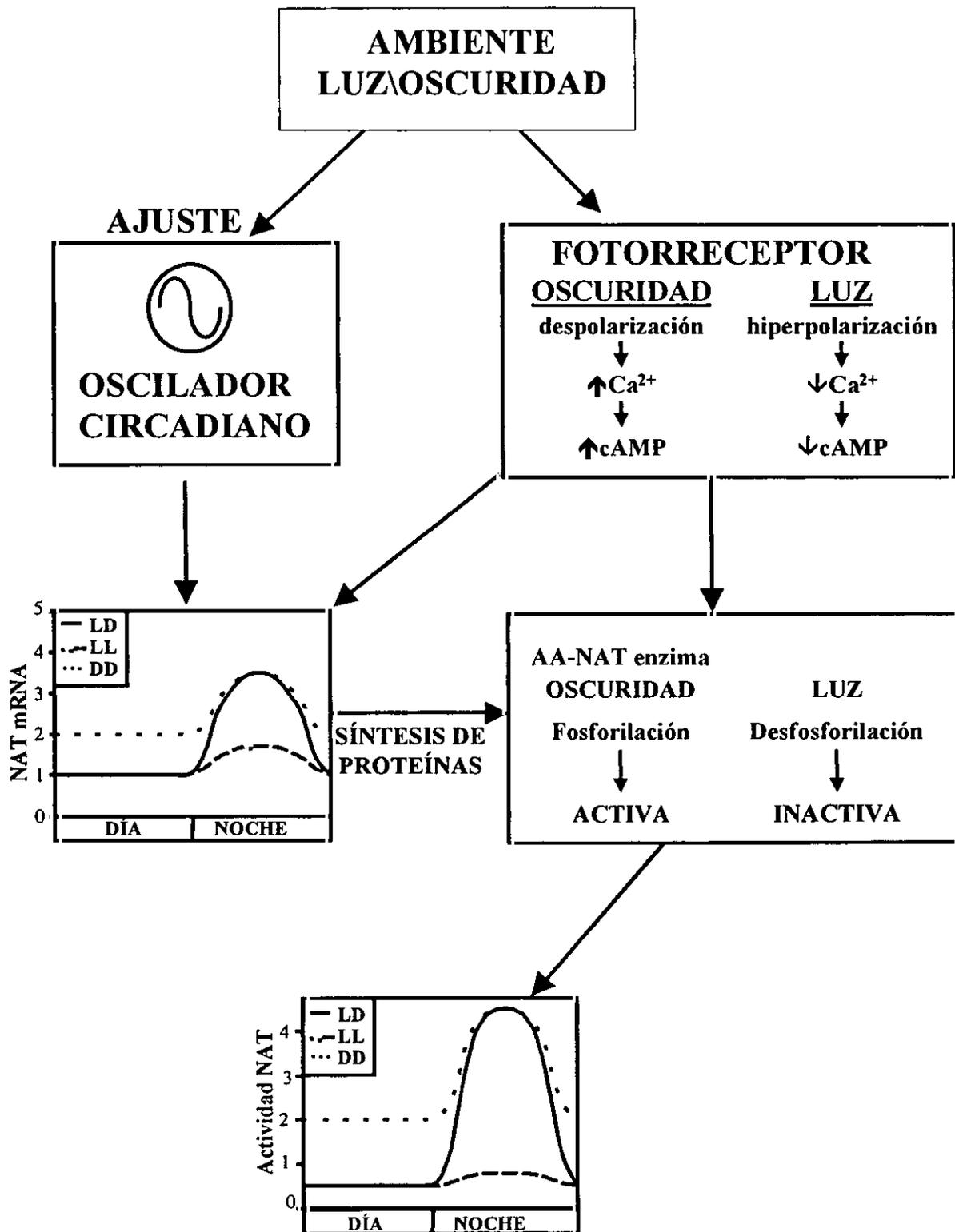
la retina, ambas clases de vertebrados muestran sus máximos niveles de mRNA de la HIOMT durante la noche (Gauer y Craft, 1996; Guerlotté *et al.*, 1996). En la glándula pineal de la rata los valores máximos de mRNA de la HIOMT se alcanzan también por la noche (Gauer y Craft, 1996), pero en el pollo ocurren durante el día (Bernand *et al.*, 1993). Sin embargo, las discrepancias en los ritmos del mRNA entre las distintas especies y la falta de correlación entre la no ritmicidad de la actividad enzimática y las variaciones diarias del contenido de mRNA retiniano hacen que el papel regulador de la HIOMT en la biosíntesis de melatonina esté aún por determinar.

### **3.2. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA EN LA RETINA.**

#### **3.2.1. REGULACIÓN POR LA LUZ.**

En la retina de todas las especies de vertebrados estudiadas, la luz regula la síntesis de melatonina. La producción de este indol muestra un perfil rítmico con sus valores mayores durante el periodo oscuro del fotociclo (peces: Cahill, 1996; anfibios: Delgado *et al.*, 1993; aves: Underwood *et al.*, 1984; Zawilska y Iuvone 1992; Zawilska y Wawrocka 1993; Adachi *et al.*, 1995; mamíferos: Faillace *et al.*, 1995; Tosini y Menaker, 1996). El fotoperíodo está regulando tanto la forma como la amplitud del ritmo de melatonina ocular. De este modo, la duración de los niveles nocturnos elevados de melatonina está directamente correlacionada con la duración de la fase oscura del ciclo diario (Underwood y Siopes, 1985; Delgado y Vivien-Roels, 1989). En *Xenopus laevis* se ha descrito un ritmo circadiano de la actividad NAT (Besharse y Iuvone, 1983) y de la liberación de melatonina retiniana (Cahill y Besharse, 1990). Es más, en esta especie, al igual que ocurre en el pollo (Zawilska y Iuvone 1992; Thomas *et al.*, 1993), se ha localizado el oscilador circadiano en los fotorreceptores retinianos (Cahill y Besharse, 1993).

Los trabajos que profundizan sobre la regulación por la luz en la retina son escasos y la mayoría estudian los cambios en la actividad NAT. En anfibios, concretamente en *Xenopus laevis*, la utilización de un sistema de copas ópticas *in vitro* ha permitido desvelar en gran parte cómo se lleva a cabo esta regulación. De este modo, se ha descrito que la exposición de retinas a luz constante es capaz de eliminar el ritmo de la actividad NAT y que la exposición breve a luz en la mitad de la fase oscura reduce rápidamente la actividad NAT hasta sus niveles basales (Iuvone y Besharse, 1983). El efecto estimulador de la oscuridad sobre la actividad NAT es mimetizado por la adición de proagonistas del cAMP (Iuvone y Besharse, 1986a). Así mismo, dicho



**Esquema 4:** Regulación de la actividad NAT por la luz. Ambos, el oscilador circadiano y la iluminación ambiental están influyendo en los niveles finales de mRNA y actividad NAT presentes en la retina. LD: Fotoperíodo 12L:12D; LL: Iluminación constante, DD: Oscuridad constante. Datos procedentes de Iuvone y Alonso-Gómez, 1997b.

efecto estimulador de la oscuridad es bloqueado tanto por la omisión de  $\text{CaCl}_2$  del medio de cultivo como por la adición de antagonistas de los canales de calcio dependientes de voltaje (Iuvone y Besharse, 1986a y b). Estos experimentos indican que el cAMP y el calcio intervienen en la regulación por la luz de la síntesis de melatonina. La oscuridad induce, al menos en parte, la síntesis *de novo* de la enzima, ya que inhibidores de la transcripción génica bloquean tanto el efecto estimulador de la oscuridad como el efecto de los proagonistas de cAMP sobre la actividad NAT (Iuvone y Besharse, 1983, 1986a). En últimos años, una serie de trabajos sugieren que en esta especie, la actividad TPH también interviene de forma activa en la regulación por la luz de la síntesis de melatonina (Cahill y Besharse, 1990, Green y Besharse, 1994). Sin embargo, no existe ningún trabajo que determine qué mecanismos moleculares ejecutan y transmiten los efectos de la oscuridad sobre la actividad TPH.

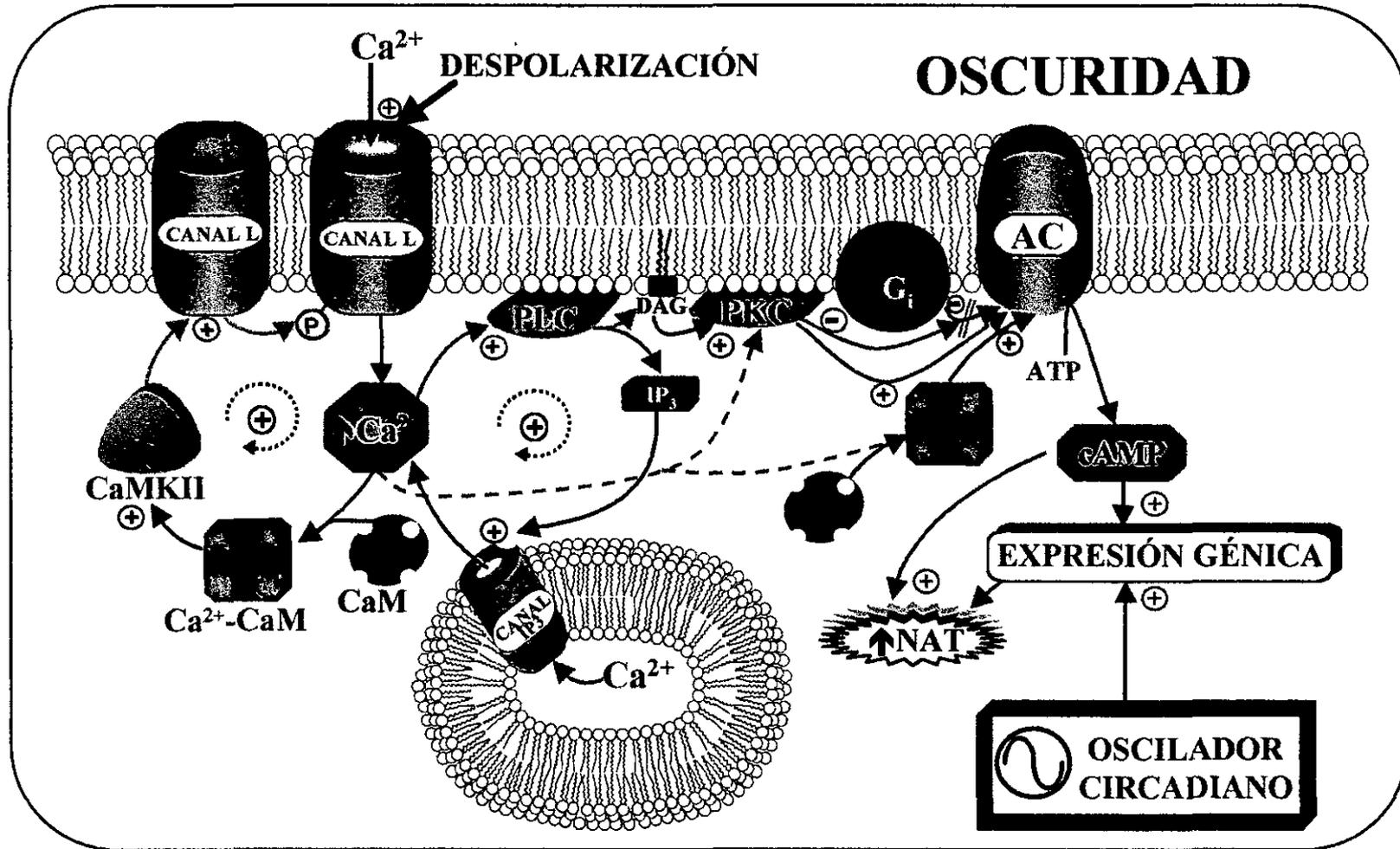
Durante los últimos años también se han realizado una serie de estudios utilizando cultivos celulares de embriones de pollo enriquecidos en células fotorreceptoras, que junto a los datos moleculares procedentes de la retina de pollos adultos, han permitido establecer un modelo bastante completo y consistente de la regulación de la síntesis de melatonina en el fotorreceptor propuesto por Iuvone y Alonso-Gómez en 1997b. Bernard y colaboradores (1997) demostraron que tanto la luz como el reloj circadiano están controlando la regulación de la actividad NAT. La luz, por un lado suprime la actividad NAT en retinas en oscuridad, y por otro es capaz de ajustar su ritmo. Ambas acciones están mediadas por cambios en los niveles del mRNA de la NAT, que dependen exclusivamente del reloj circadiano siendo independientes del régimen lumínico, y de modificaciones posttranscripcionales, que son las responsables de la inhibición aguda por la luz sobre la actividad enzimática (Esquema 4).

Los fotorreceptores están despolarizados en oscuridad y se hiperpolarizan en respuesta a la luz. Niveles elevados de potasio en el medio despolarizan el fotorreceptor mimetizando el efecto de la oscuridad y estimula la actividad NAT por un mecanismo dependiente de calcio (Avendano *et al.*, 1990). Concentraciones despolarizantes de  $\text{K}^+$  abren los canales del calcio dependientes de voltaje (Gleason *et al.*, 1992) provocando un incremento sostenido de la concentración del calcio en el segmento interno del fotorreceptor (Uchida y Iuvone, 1997). La elevación de los niveles de calcio activa una adenilato ciclasa dependiente de calmodulina (Alonso-Gómez y Iuvone, 1995b; Iuvone y Alonso-Gómez, 1995) aumentando los niveles de

cAMP (Iuvone *et al.*, 1991), que a través de la PKA inducen fenómenos de fosforilación que, en último término, estimulan la actividad NAT (Avendano *et al.*, 1990; Gan *et al.*, 1995; Iuvone *et al.*, 1990) mediante un mecanismo postranscripcional (Alonso-Gómez y Iuvone, 1995a) (Esquema 5). La luz es el agente encargado de finalizar la señal, al hiperpolarizar el fotorreceptor cerrando los canales de calcio.

La elevación de la actividad NAT se mantiene durante casi toda la noche por lo que se necesita un aumento sostenido de los niveles de calcio y cAMP intracelulares. Al menos dos lazos de retroalimentación positiva intervienen en el mantenimiento de estas respuestas sostenidas (Esquema 5). Durante la despolarización, aumentan tanto al entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  como la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en el fotorreceptor (Alonso-Gómez e Iuvone, 1995b; Uchida e Iuvone, 1997). Inhibidores de la calmodulina o la CaMKII disminuyen la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Alonso-Gómez *et al.*, 1996, Uchida y Iuvone, 1997) provocada por condiciones despolarizantes, siendo los efectos de dichos inhibidores revertidos por la adición del agonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, Bay K8644. Estos resultados sugieren un mecanismo de fosforilación mediado por la CaMKII que, al igual que el Bay K8644, aumentaría el tiempo de apertura del canal que había sido previamente abierto por despolarización (Nowycky *et al.*, 1985). De este modo, una entrada de calcio inicial daría lugar a una respuesta sostenida y que no se inactiva.

El otro posible lazo de retroalimentación positiva sería la activación de la fosfolipasa C (PLC) (Esquema 5). Se ha demostrado que tras la despolarización se produce un activación de la fosfolipasa C (Gan e Iuvone, 1997) que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato en inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DAG). En el segmento interno y en los terminales sinápticos del fotorreceptor se han localizado receptores de  $\text{IP}_3$  (Peng *et al.*, 1991; Day *et al.*, 1993) sugiriendo una posible intervención de los depósitos intracelulares de calcio en el mantenimiento sostenido de la elevación de calcio intracelular. Así mismo, los inhibidores de la proteína quinasa C (PKC) disminuyen la acumulación de cAMP y la estimulación de la actividad NAT causada por la despolarización en fotorreceptores. Además, los ésteres de forbol potencian la actividad adenilato ciclasa en fotorreceptores permeabilizados (Iuvone *et al.*, 1996) sugiriendo que la PKC interviene en la regulación de la síntesis de melatonina potenciando la respuesta de la AC al calcio.



**Esquema 5:** Modelo de los mecanismos celulares de regulación por la luz de la actividad NAT en los fotorreceptores retinianos. Datos de Iuvone y Alonso-Gómez, 1997b.

### 3.2.2. REGULACIÓN POR NEUROTRANSMISORES RETINIANOS: DOPAMINA.

De los múltiples neurotransmisores retinianos únicamente se ha descrito en detalle el efecto de la dopamina sobre la síntesis de melatonina. El motivo principal que ha contribuido a este estudio es que en la retina de todas las especies de vertebrados estudiadas dopamina y melatonina ejercen funciones antagónicas, mimetizando la dopamina el papel de la luz y la melatonina el de la oscuridad. Aunque el papel regulador de la dopamina en la síntesis de melatonina se ha determinado en varias especies, la mayoría de los trabajos se han realizado utilizando un sistema de cultivo de copas ópticas de *Xenopus laevis* o pollo y en cultivos celulares de células embrionarias de pollo enriquecidos en fotorreceptores.

La síntesis y liberación de dopamina es estimulada por la luz (Iuvone *et al.*, 1978; Pakinson y Rando, 1983; Boatright *et al.*, 1989). La adición de dopamina y sus agonistas mimetiza el efecto inhibitorio de la luz sobre la actividad NAT y la liberación de melatonina retiniana (Cahill y Besharse, 1991; Iuvone y Besharse, 1986c; Nguyen-Legros *et al.*, 1996; Zawilska y Iuvone, 1989). Estos efectos están mediados por receptores de la familia D<sub>2</sub> (Iuvone *et al.*, 1987). En algunas especies, como en *Xenopus laevis*, la dopamina mimetiza el efecto de la luz ajustando la fase del ritmo circadiano de melatonina (Cahill y Besharse, 1991). En otras, como en el pollo, se ha descrito que la dopamina potencia el efecto inhibitorio de intensidades de luz mesópicas sobre la actividad NAT (Iuvone *et al.*, 1995).

En los fotorreceptores, la disminución de los niveles de cAMP provocada por la unión de la dopamina con su receptor es la responsable de la inhibición de la actividad NAT (Iuvone, 1986; Iuvone *et al.*, 1990). Aunque se ha demostrado que la activación de los receptores de dopamina disminuye la formación de cAMP, no se ha podido determinar un acoplamiento directo del receptor de dopamina a la adenilato ciclasa (Zawilska *et al.*, 1995). Es más, en cultivos de fotorreceptores se ha demostrado que en condiciones despolarizantes, la dopamina impide la entrada de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> a través de canales sensibles a dihidropiridinas del fotorreceptor, siendo los efectos de la dopamina y agonistas D<sub>2</sub> bloqueados por antagonistas D<sub>2</sub> o por la toxina pertussis (Alonso-Gómez *et al.*, 1996; Iuvone y Alonso-Gómez, 1997a). Así mismo, estudios de "patch-clamp" en segmentos internos de bastones de *Xenopus laevis* concluyen que la dopamina y los agonistas D<sub>2</sub> modulan la corriente activada por hiperpolarización mediante la activación de

una proteína G en un proceso en el que interviene el calcio pero no el cAMP (Akopian y Witkovsky, 1996). Estos datos sugieren un modelo donde la dopamina interaccionaría con su receptor y a través de una proteína G cerraría los canales de calcio tipo L. De este modo, se produciría una disminución de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, una inactivación de la AC y, por tanto, una disminución de los niveles intracelulares de cAMP. El descenso de los niveles de cAMP es el responsable, en último término, de la inhibición de la actividad NAT y de la producción de melatonina.

## **II. OBJETIVOS**

En los últimos años se ha confirmado el importante papel de la melatonina como señal hormonal del fotoperíodo que regula diaria y estacionalmente un gran número de ritmos endocrinos, neurales y de comportamiento. Así mismo, también han sido ampliamente descritas las funciones paracrina de la melatonina como neuromodulador de la retina, siendo un elemento fundamental en los procesos de adaptación a la visión nocturna.

Aunque existen numerosos estudios sobre la importancia de la luz en la regulación y ajuste del ritmo de síntesis y liberación de melatonina, muy pocos trabajos intentan determinar los mecanismos celulares y moleculares implicados en la regulación por la luz de la síntesis de esta indolamina. Además, los escasos trabajos existentes únicamente determinan los cambios de una de las enzimas de su ruta de síntesis, la NAT, no disponiéndose de información sobre otra de las actividades limitantes de flujo, la TPH.

Por tanto, el objetivo global de esta tesis doctoral es profundizar en los mecanismos celulares de regulación por la luz y otros neurotransmisores retinianos de la síntesis de la melatonina, determinando los cambios experimentados por la actividad TPH en las células fotorreceptoras de la retina del anfibio *Xenopus laevis*.

Para llevar a cabo este objetivo, hemos escogido como modelo un sistema de cultivo estático de copas ópticas de anfibios, que ha sido utilizado con éxito por nuestro grupo de investigación para el estudio de la actividad NAT y la liberación de melatonina en *Rana perezi*. Sin embargo, es importante señalar que la actividad TPH en la retina se localiza, no sólo en los fotorreceptores, sino también en las neuronas serotoninérgicas, por lo que para el estudio de la actividad TPH del fotorreceptor se hace necesario la puesta a punto de un método de lesión ocular que nos permita obtener retinas que posean mayoritariamente fotorreceptores. En esta memoria se evaluarán las acciones neurotóxicas del ácido kaínico (KA), analizándose las condiciones adecuadas para su utilización como neurotóxico específico. Así mismo, se hace necesaria la puesta a punto de una técnica que nos permita valorar la actividad TPH. Entre los múltiples métodos descritos en la bibliografía se desarrollará y optimizará un ensayo *in situ* que permita el estudio de la actividad enzimática en condiciones fisiológicas. De modo paralelo a la determinación de la actividad enzimática, se estudiarán los cambios en la expresión génica de la TPH valorándose su contenido de mRNA. Además, se pondrá a punto la metodología necesaria

para la determinación de varios mensajeros intracelulares, como la entrada de calcio y la acumulación de cAMP en los fotorreceptores.

Tras la optimización de estas condiciones experimentales, se pasará al estudio del efecto del fotoperíodo sobre la actividad y la expresión del gen de la TPH, para lo que se evaluarán ambos parámetros durante el ciclo diario.

Una vez determinada la importancia de la luz, se estudiarán los cambios que provoca este factor ambiental en la fisiología de los fotorreceptores de anfibios y cómo afectan en último término a los niveles de la actividad TPH. Para conseguir este objetivo se utilizarán herramientas farmacológicas que nos permitan individualizar las distintas etapas de las cascadas de los segundos mensajeros iniciadas por la oscuridad. Nos centraremos en el estudio de los sistemas del cAMP, cGMP y el calcio.

Finalmente, se evaluará el papel de dos importantes neuromoduladores retinianos, la dopamina y la adenosina, sobre la síntesis de melatonina. Se estudiarán los tipos de receptores de membrana presentes en el fotorreceptor, mediante agonistas y antagonistas específicos. Una vez identificados, se investigará cómo dichos receptores están acoplados a los sistemas de mensajeros intracelulares y cómo transducen la señal hasta modificar la actividad TPH.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. MATERIALES

### 1.1. PRODUCTOS

#### - Reactivos

- Acetil Coenzima A (Sigma, A-2056)
- Acetato sódico (Fisher, S-210)
- Acetonitrilo (Fisher, A998-4; Scharlau)
- Ácido ascórbico (Sigma, A-4544)
- Ácido clorhídrico (Merck, 317; Fisher, A144)
- Ácido glutámico (Sigma, G-1251)
- Ácido ortofosfórico (Fisher, A260)
- Ácido perclórico (Baker Inc., 4805-01)
- Ácido tricloroacético (Fisher, A322)
- Agarosa. Ensayos de rutina (Sigma, A-9539)
- Agarosa. Punto de fusión bajo. (Sigma, A-9414)
- Albúmina sérica bovina (Sigma, A-7030)
- Alcohol isoamilo (Fisher, A393)
- Alúmina neutra Tipo WN-3 (Sigma, A-9003)
- 3-Aminobenzoato de etilo. Metanosulfonato (Sigma, A-5040)
- cAMP (Sigma, A-6885)
- ATP (Pharmacia, 27-2056-01)
- Azul de bromofenol (Sigma, B-8026)
- Bicarbonato sódico (Sigma, S-8875)
- Borax (Sigma, B-9876)
- Bromuro de etidio (Sigma, E-1510)
- Carbógeno (5%CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>) (SEO; Puritan Bennet)
- Carbonato sódico (Merck, 6392; Sigma, S-6139)
- Citrato sódico (Baker, 3646)
- Cloroformo (Fisher, C-297)
- Cloruro cálcico (Sigma, C-7902)
- Cloruro magnésico (Sigma M-0250)
- Cloruro sódico (Sigma, S-9888)

- Compuesto de inclusión LX112 (Ladd Research Industries, Burlington, VT)
- Dimetilsulfóxido (Sigma, D-5879)
- Dopamina (Sigma, H8502)
- Dowex-AG50W-X4 (200-400 mesh) (BioRad, 192-1351)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma, L-6026)
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Scharlau, Ac965; Sigma, ED-2SS)
- EGTA (ácido etilenglicol-bis-( $\beta$ -ester de aminoetilo)-N,N,N',N', tetraacético) (Sigma, E-4378)
- Enzimas de restricción:
  - Hind III (GIBCO, 15207-012)
  - Xba I (GIBCO, 15226-012)
  - Xho I (GIBCO, 15231-012)
- Etanol (Merck, 983)
- Eter dietílico (Fisher, E-134)
- Ficoll 400
- Formamida (Sigma, F9037)
- Formaldehido (Fisher, F-79)
- Fosfato de piridoxal (Sigma, P9255)
- Fosfato dipotásico (Panreac, 141512)
- Fosfato disódico (Merck, 6586)
- Fosfato monopotásico (Panreac, 141509)
- Fosfato monosódico (Merck, 9090)
- Fragmento largo de la polimerasa de DNA tipo I (Klenow)(GIBCO, 18012-021)
- Glicerol (Sigma, G-8773)
- GTP (Pharmacia, 27-2076-01)
- HEPES (Sigma, H-3375)
- Hidróxido potásico (Panreac, 141515)
- Hidróxido sódico (Merck, 6498)
- 5-Hidroxitriptófano (Sigma, H-9772)
- Isopropanol (Sigma, I-9516)
- Isoproterenol (Sigma, I-6504)
- Líquido de centelleo Ecolume (I.C.N., 882470)
- 2-Mercaptoetanol (Sigma, M-6250)

- Metanol (Fischer, A-452)
- MOPS (Sigma, M-8899)
- Octanosulfonato sódico (Sigma, O-8380; O-4003)
- Pirocarbonato de dietilo (DEPC) (Sigma, D-5758)
- Polivinilpirrolidona (Sigma, P-5288)
- Protosol (Dupont, NEF-935)
- Promotores aleatorios (GIBCO, 48090-011)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac, 251567; Sigma, F-9252)
- Serotonina. Hidrocloruro (Sigma, H-9523)
- Solución de DNA de esperma de salmón (<sub>ss</sub>DNA) (GIBCO, 15632-011)
- Sulfato cúprico (Probus, 52367)
- Sulfato de dextrano (Pharmacia, 17-0340-01)
- Tartrato sódico-potásico (Merck, 8087)
- Tolueno (Sigma, T-8317; Fisher, T313-4)
- Triptamina. Hidrocloruro (Sigma, T-9628)
- Trizma base (Sigma, T-0377)
- Triton X-100 (Sigma, X-100)
- Trizol (GIBCO, 15596-D026)
- UTP (Pharmacia, 27.2086.01)

#### - **Radionucléidos**

- 1-[<sup>14</sup>C] Ácido glutámico (actividad específica 55mCi/mmol)(Amershan, CFA-531)
- Adenosina [2,8<sup>3</sup>H] (actividad específica 26.9Ci/mmol) (Dupont, NET-063)
- <sup>14</sup>C-cAMP (actividad específica 56 mCi/mmol) (Moravec Biochemicals)
- 3,4,5-[<sup>3</sup>H]-L-leucina (actividad específica 162 Ci/mmol) (Dupont, NET-460)
- [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]-dCTP (actividad específica 3000Ci/nmol)(Amershan PB10205)
- <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (actividad específica 30 mCi/mg) (Dupont, NEZ 013)

#### - **Medios de Cultivos**

- Solución de aminoácidos MEM (GIBCO 21135)
- Medio de cultivo para anfibios (Wolf y Quimby) (GIBCO 21835)
- Medio 199 (GIBCO 31100)

**Filtros y membranas**

- Filtros estériles Acrodisc de 0,2  $\mu\text{m}$  (Gelman Science, 4192)
- Papel de fosfato de celulosa para cromatografía (Watmann P81 3mm)
- Filtros de papel de celulosa de 2,3 cm de diámetro (Watmann 1030023)
- Membrana de nitrocelulosa (Protran BA, Schleicher & Schuell)

**Fármacos**

- Actinomicina D-mannitol (Sigma, A-5156)
- Adenosina desaminasa (Sigma, A-5043)
- ( $\pm$ ) Bay K 8644 (R.B.I., B-112)
- Calfostina C (Calbiochem, 208725)
- CGS 21680 (R.B.I., C-141)
- CGS 4393B (Ciba-Geigy)
- Cicloheximida (Sigma, C-6255)
- N<sup>6</sup> Ciclohexiladenosina (CHA) (R.B.I., A-002)
- 8-Ciclopentil-1,3- dimetilxantina (CPT) (R.B.I., C-102)
- 5'-N-ciclopropil-carboxamido-adenosina (CPCA) (R.B.I., C-103)
- $\omega$ -Conotoxina. Sal de TFA (R.B.I., C-110)
- Chelerritrina. Hidrocloruro (R.B.I., C-198)
- N<sup>6</sup>2'-O-Dibutiladenosina 3':5'-monofosfato cíclico (dbcAMP). Sal sódica (Sigma, D-0627)
- N<sup>2</sup>,2'-O-Dibutilguanosina 3':5'-monofosfato cíclico (dbcGMP). Sal sódica (Sigma, D-3510)
- 3,7-Dimetil-1-propargilxantina (DMPX) (R.B.I., D-124)
- Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina. Hidrocloruro. (EHNA) (R.B.I., E-114)
- Espiperona (Sigma, S-7395)
- S(-)Etilcloprida. Hidrocloruro (R.B.I., E-101)
- Forskolin (Calbiochem, 344270; Sigma, F-6886)
- m-Hidroxibencilhidracina (Sigma, H-9382)
- H-8. (N-[2-(metilamina)etil]-5-isoquinolinosulfonamida). Hidrocloruro (R.B.I., H-122)
- H89 (N-[2-(p-Bromocinamilamina)etil]-5-isoquinolinosulfonamida. Dicloruro. (Biomol, EI-196)
- 3-Isobutylmetilxantina (IBMX) (Sigma, I-5879 )
- KN-92 2-[N-(4-metoxibencenosulfonil)]amino-N-(4-clocinamil)-N-metilbencilamina) (R.B.I., K-112)

- KN-93 N-[2-[[[3-(4'-clorofenil)-2-propenil)-metilamina]metil]fenil]-N-2-hidroxietil)-4'-metoxi-fostato de benzenosulfonamida) (R.B.I., K-110)
- KT 5926 (Biomol, EI-201)
- 4-[[3,4-(Metilendioxi)benzil]amino]-6-cloroquinazolino (MBCQ) (Tocris, 0874)
- 8-Metoximetil-1-metil-3-(2-metilpropil)xantina. (8-MIBMX) (Biomol, PD-150)
- Nifedipino (Sigma, N-7634)
- Nitrendipino (R.B.I., N-144)
- S-(4-Nitrobenzil)-6-tioinosina (NBTI)(R.B.I., N-127)
- Quimpirol (R.B.I., Q-102)
- Ro 20-1724 (R.B.I., R-111)
- R(+)-SCH-23390. Hidrocloruro (R.B.I., S-054)
- Sepiapterina (R.B.I., S-154)
- SKF-38393. Hidrocloruro (R.B.I., S-101)
- L-Triptófano (Sigma, T-8659)
- Zaprinast (Sigma, Z-0878)

## 1.2. INSTRUMENTAL

- Agitador multitubos (Corning, modelo 4010)
- Agitador orbital (Lab-line)
- Balanzas de precisión (Sartorius; Sauter 404 y Denver Instrumental Company A-160)
- Baño de órganos termostatzado (Unitronic, 320 OR y Dubnoff).
- Bomba de doble pistón para cromatografía de alta presión (Bromma, LKB 2150 y controlador 2152; Waters 590)
- Cámara de aclimatación con fotoperiodo y temperatura controlados
- Cámaras de cultivo herméticas, transparentes y opacas.
- Cámaras de cultivo de metacrilato, herméticas y transparentes (Plas-lab).
- Cámara fotográfica para geles (COHU Solid State Camera)
- Catéter Venocath-18 (Abott, 4718)
- Célula analítica coulométrica (ESA, 5011)
- Célula acondicionadora coulométrica (ESA, 5021)
- Centrifuga refrigerada. (Beckman, CS-6KR)
- Colorímetro (Atom, Data-test atom 366).

- Columnas de cromatografías (Whatman, 4621-0502; Tracer analítica N14763).
- Columnas de cromatografía Disposaflex (8 mm x 200 mm.) (Kontes, 40160-0000)
- Congelador a -25°C (Liebherr) y a -80°C (Forma Scientific).
- Contador  $\beta$  (Beckman, modelo LS 6500)
- Cubeta de electroforesis horizontal (GIBCO, Model H5)
- Detectores amperométricos (BASS LC-4B y Princenton Applied Research 400)
- Detector coulométrico (ESA, modelo coulochem II)
- Diluidor (Gilsom 401)
- Escaner para pantallas de fosfografía (Molecular Dynamics, PhosphorImager 445SI)
- Espectrofotómetros (Beckman, Du-50; Milton Roy Espectronic, 1201)
- Generador de corriente para electroforesis (Bio-Rad, Power Pac 300)
- Horno de hibridación (Hybaid)
- Iluminador de fibra óptica (Dyonics 375)
- Iluminador ultravioleta (Ultraviolet Transilluminator UVB-20)
- Inyectores Automáticos (Gilson, 230; Perkin-Elmer, ISS-100)
- Jeringuillas de microinyección Hamilton (10  $\mu$ l)
- Lupa binocular (Zeiss y Meiji EMT)
- Microcentrífuga (Heraeus, Biofuge 13)
- Pantalla de fosfografía (Molecular Dynamics, Phosphor Screen 35 X 43 cm)
- pH-metros (Crison Digit 501; Fisher Scientific, Accument Basic)
- Pipetas automáticas (Gilson y Kartell)
- Placas de cultivo de 24 pocillos (volumen 3 ml) (Falcon 3047; Corning 25820)
- Programas informáticos:
  - Imagen Quant 3.3 (Molecular dynamics)
  - Lynx 5.1 (Applied Imaging)
  - Biocrom 2000 (Micron Analítica)
- Refrigerador de muestras (mgw Lauda RM6)
- Sonicadores (Sonics and Materials Inc., Vibra Cell; Kontes, Micro Ultrasonic Cell Disrupter)
- Videocámara (Vicon Mod. UC2400)

### **1.3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

En los experimentos de esta memoria se utilizaron ejemplares adultos (edades comprendidas entre 6 meses y un año) de *Xenopus laevis*. La mayor parte de los animales fueron de origen comercial (Nasco, Fort Atkinson, Winconsi, E.E.U.U.), excepto para la realización de parte de los experimentos del apartado IV.3.2.2.c de los resultados en los que se utilizaron *Xenopus laevis* reproducidos y criados en nuestro laboratorio.

En ambos casos, una vez en el laboratorio, los animales se mantuvieron en cámaras de aclimatación con fotoperiodo (12L:12D) y temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) controlados hasta el día del experimento. Durante este periodo los sapos se encontraban en acuarios transparentes (15 ejemplares por acuario) con agua previamente desclorada por filtración con carbón activado durante al menos dos días.

Los animales procedentes de Nasco se alimentaron con escamas para *Xenopus laevis* compradas a Nasco. Los animales obtenidos en nuestro laboratorio se alimentaron con hígado de pollo fresco. En ambos casos, la alimentación se realizó 3 veces por semana y los alimentos se suministraron durante 2 horas, que es tiempo suficiente para que los animales se encuentren saciados, retirándose los restos de comida no ingerida.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. LESIONES OCULARES**

#### **2.1.1. INYECCIONES INTRAOCULARES DE ÁCIDO KAÍNICO**

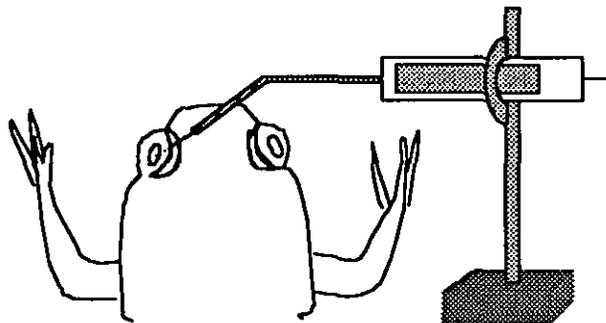
Para la obtención de retinas enriquecidas en fotorreceptores, una semana antes del experimento, los animales eran inyectados intraocularmente con la neurotoxina ácido kaínico (KA). Este agonista glutaminérgico produce una activación tónica de los receptores de glutamato tipo kainato induciendo una entrada masiva de calcio en el citosol y la consiguiente muerte celular por excitotoxicidad (Olney, 1978).

Para la realización de las inyecciones oculares de KA se utilizó un sistema que consistió en una aguja del 30<sup>1/2</sup> conectada a un catéter de 0,5 mm de diámetro interno, que por su otro extremo estaba unido a una jeringuilla Hamilton de 10  $\mu\text{l}$ .



El KA (10,66 ó 21,32 mg/ml) se disolvió en una solución de cloruro sódico al 0,6%. Debido al carácter ácido de este compuesto y a su escasa solubilidad a pH menor de 6, hubo que añadir entre 2 y 6 µl de una solución de hidróxido sódico 10 N para su completa disolución. Una vez disuelto, el pH final de la solución se comprobó utilizando papel indicador de pH. Dicho pH siempre estuvo comprendido entre 7 y 7,5. El volumen de la inyección fue de 1 µl.

Los animales se anestesiaron con 3-aminobenzoato de etilo (0,375 g/l de agua). Una vez anestesiados, se realizó una ligera presión con el dedo índice en la parte dorsal del interior de la cavidad bucal forzando a sobresalir a la orbita ocular. La inyección se realizó insertando la aguja a través de la *ora serrata* con un ángulo de 45° hasta alcanzar el humor vítreo. Tras inyectar 1 µl de la solución de KA, se esperó 5 segundos antes de retirar lentamente la aguja para permitir la difusión de la solución dentro del ojo.



Excepto para los experimentos de concentración-respuesta del neurotóxico, la concentración final de KA fue de 50 ó 100 nmol por ojo. La concentración usada estuvo en función del tamaño corporal, es decir, 50 nmol/ojo para animales cuyo peso estaba comprendido entre 15 y 25 g y 100 nmol/ojo para pesos entre 25 y 45 g. En los experimentos que requerían un grupo control, uno de los dos ojos fue inyectado con la solución salina al 0,6%. En todos los casos, las inyecciones intraoculares se realizaban una semana antes del cultivo de las copas ópticas.

### 2.1.2. LISIS DE LA RETINA INTERNA CON TRITON X-100

Otra de las técnicas descritas en la bibliografía para la obtención de preparaciones de fotorreceptores es la lisis celular utilizando detergentes (Cahill y Besharse, 1992). Una vez decapitado el animal y preparadas las copas ópticas según el procedimiento que se explica en el apartado 2.2, el interior de la copa óptica se lavó con una solución de Triton X-100 al 1 % en agua destilada. Dicha solución se suministraba mediante una jeringuilla conectada a una aguja del 30<sup>1/2</sup> durante 30 segundos manteniéndose un flujo continuo de 1 ml/min. A continuación, la copa óptica se dejaba llena de la solución de Triton X-100 durante otros 90 segundos. El mismo procedimiento se repitió utilizando agua destilada en lugar de Triton X-100. Tras lavar la copa óptica con la solución salina para el cultivo de copas ópticas (SC) que se describe en el apartado 2.3.a, las copas ópticas se cultivaron durante 1 hora en SC. Finalmente, la capa correspondiente a la retina interna se separó de la capa de fotorreceptores congelándose ambas capas en tampón fosfato 250 mM (véase apartado 2.4.2.b).

### 2.2. OBTENCIÓN DE LAS COPAS ÓPTICAS

Una vez decapitado y desmedulado el animal, el globo ocular se extrajo utilizando unas tijeras de cirugía de punta curva (de 10 cm de longitud). Tras la inmersión del ojo en una solución salina para extracción de tejidos (SSE: NaCl 82,5 mM, KCl 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, pH 7,4) y con la ayuda de una lupa binocular, se procedió a retirar la cornea y el iris realizando una incisión en la *ora serrata* y cortando alrededor de la misma con unas tijeras de iridectomía. Finalmente, se retiraron el cristalino y el humor vítreo, quedando la copa óptica preparada para su posterior procesamiento.

### 2.3. CULTIVO DE COPAS ÓPTICAS

#### a) Medios de cultivo

Para la realización de los experimentos de esta memoria se utilizaron los siguientes medios de cultivo.

#### - MABA

- Medio 199 (6,6 g/l)
- Albúmina sérica bovina (0,75 g/l)
- NaHCO<sub>3</sub> (30 mM; 2,52 g/l)
- Ácido ascórbico (50 µM; 8,81 mg/l)

**- MAWQ**

- Medio de cultivo para anfibios (Wolf y Quimby)
- NaHCO<sub>3</sub> (9,04 mM; 0,76 g/l) La concentración final en el medio fue de 30 mM.
- Ácido ascórbico (50 μM; 8,81 mg/l)

**- Solución salina para el cultivo de copas ópticas (SC)**

- NaCl (82,5 mM)
- KCl (2 mM)
- MgCl<sub>2</sub> (1 mM)
- CaCl<sub>2</sub> (1,8 mM)
- NaHCO<sub>3</sub> (35 mM)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 mM)
- Glucosa (5 mM)
- Ácido ascórbico (0,1 mM)
- Solución de aminoácidos MEM (1ml/100ml)

Todos los medios anteriormente descritos, se saturan con carbógeno (95% O<sub>2</sub>: 5% CO<sub>2</sub>), ajustándose su pH a 7,4 con NaOH 10 N ó HCl 10 N según sea necesario.

**b) Procedimiento general del cultivo**

Tras la disección de las copas ópticas, siguiendo el método explicado en la sección 2.2, se preincubaron 30 minutos en el medio correspondiente. Dicho periodo es necesario para conseguir la acomodación del tejido ocular al medio. Tras esta preincubación, las copas ópticas se colocaron individualmente en placas de cultivo de 24 pocillos con un volumen de 1,25 ml de medio por pocillo. A continuación, se utilizó uno de los siguientes protocolos:

**• Método 1.**

Las placas se colocaron en cámaras herméticamente cerradas y saturadas con carbógeno. Dependiendo de las condiciones de cultivo, dichas cámaras fueron transparentes (cultivo en luz), o totalmente negras (cultivo en oscuridad). La incubación se realizó a una temperatura de 20±0,1°C, introduciendo las cámaras herméticas en un baño termostatzado. El cultivo en condiciones de luz se realizó exponiendo las cámaras transparentes a la luz proporcionada por

tubos fluorescentes (intensidad total 45 W). En los experimentos realizados en el departamento de Biología Animal II (U.C.M.) se utilizó este método.

• Método 2.

Las placas de cultivo se introdujeron en cámaras de metacrilato transparentes y herméticamente cerradas, cuya atmósfera estaba saturada con carbógeno. Para los cultivos en oscuridad dichas cámaras se envolvieron en un saco de tela gruesa, negra y opaca. La incubación se realizó a temperatura ambiente ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ) y sobre un agitador orbital (60 rpm). En los cultivos en luz, la iluminación se suministró por un iluminador de fibra óptica (intensidad de luz 150 W). En los experimentos realizados en el departamento de farmacología de Emory University se utilizó este método.

Cuando se comparan los resultados de experimentos similares realizados utilizando ambos protocolos, no se encontraron diferencias apreciables en los valores de la actividad TPH.

## 2.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 2.4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPTÓFANO HIDROXILASA

#### 2.4.1.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH *IN SITU*

##### a) Fundamento de la reacción

La determinación de la actividad TPH se realizó siguiendo el método descrito por Green y colaboradores en 1995 con algunas modificaciones. Esta técnica se basa en la acumulación del producto final de la reacción, 5-hidroxitriptófano (5OHTrp), que se produce tras inhibir con *m*-hidroxibencilhidracina (mHBH) la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD), enzima que actúa inmediatamente después de la TPH en la ruta de síntesis de serotonina y melatonina. El mecanismo de acción del mHBH es impedir la unión de la AAAD a su cofactor, el fosfato de piridoxal.

##### b) Procedimiento

Dependiendo de que las retinas procedieran de ojos intactos o lesionados se utilizaron dos procedimientos distintos.

##### - Copas ópticas procedentes de ojos intactos o inyectados con salino.

La reacción comenzó con la adición a los pocillos de 250  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo suplementado con 5,85 mM de L-Triptófano (L-Trp, sustrato de la reacción) y 60  $\mu\text{M}$  de mHBH,

siendo la concentración final en el medio durante el tiempo de reacción de 1 mM y 10  $\mu$ M, respectivamente. La adición de estos compuestos en los distintos grupos experimentales se realizó utilizando el mismo medio en que se habían estado cultivando las copas ópticas hasta ese momento (conservándose, por tanto, la concentración de los fármacos utilizados en cada grupo experimental). Tras la adición de estos compuestos, el cultivo se prolongó durante otros 60 minutos, tiempo considerado como el tiempo de reacción. La reacción finalizó con la extracción de la retina neural. Para ello, la copa óptica se traspasó a una placa de cultivo de 35 mm conteniendo 6 ml de SSE (ver apartado 2.2) y, con ayuda de una lupa binocular, la retina neural se extrajo sin epitelio pigmentado. La retina neural se sumergió en 80 ó 120  $\mu$ l (en función del sistema de HPLC utilizado para la determinación del contenido de 5OHTrp) de una solución 0,3 N de ácido perclórico con 0,4 mM de metabisulfito sódico, 0,4 mM de EDTA y 25 pmol/ml de isoproterenol como estándar interno. Las muestras se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la determinación de su contenido de 5OHTrp por HPLC.

En todos los experimentos, uno de los grupos no recibió ni Trp ni m-HBH denominándose **blanco**. Dicho grupo indica, por tanto, el contenido de 5OHTrp basal o inicial a tiempo cero.

#### - Copas ópticas procedentes de ojos lesionados con KA

La reacción se lleva a cabo siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, pero en este caso se añaden 250  $\mu$ l de medio de cultivo suplementado con 225  $\mu$ M de L-Trp y 60  $\mu$ M de mHBH, siendo la concentración final de 62,5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, respectivamente. Así mismo, el tiempo de reacción para las copas ópticas fue de 30 minutos.

#### **c) Determinación del contenido de 5-hidroxitriptófano por HPLC**

Las técnicas de cromatografía de alta presión o HPLC van a permitir la separación de compuestos debido a su distinta afinidad por dos fases distintas. Una fase estática que en nuestro sistema se va a encontrar empaquetada dentro de la columna (fase estacionaria), y una fase que fluye a través de la primera y, por tanto, denominamos fase móvil. En nuestro sistema la fase estacionaria es una columna C18 de fase reversa. De este modo, el tiempo de elución o retención de los distintos compuestos de la muestra está en función de su hidrofobicidad, eluyendo en primer lugar los compuestos mas hidrofílicos. Además, la adición a la fase móvil de un par iónico, el octanosulfonato sódico, va a retener selectivamente los compuestos con cargas positivas, retardando su elución.

### - Instrumental y condiciones analíticas

Para la determinación del contenido de 5OHTrp retiniano se utilizaron dos sistemas de HPLC acoplados a dos detectores electroquímicos distintos: coulométrico y amperométrico. Los sistemas constaban de los siguientes elementos.

#### - Sistema amperométrico

- Bomba peristáltica de doble piston Bromma LKB 2150. Flujo: 1,5 ml/min
- Inyector automático Pekin Elmer ISS-100 (loop 50µl)
- Columna C18 Ultrasphere ODS. Tamaño de partícula: 5 µm. Diámetro interno: 4,6 mm. Longitud: 25cm (Beckman 235329).
- Detector amperométrico BASS LC-4B. Potencial: 500 mV. Sensibilidad 5 nA
- Interface Dionex con software Dionex AI-456 para la transformación de la señal analógica del detector a digital y el posterior análisis matemático.

#### - Sistema coulométrico

- Bomba peristáltica Water 590. Flujo: 1 ml/min
- Inyector manual Reodine (loop 25 µl)
- Columna C18 spherisorb ODS-2. Tamaño de partícula: 5 µm. Diámetro interno: 4,6 mm. Longitud: 12,5 cm (Tracer)
- Célula acondicionadora (ESA 5021): Potencial= 0 mV; Sensibilidad 50 nA
- Célula analítica (ESA 5011):
  - Electrodo 1: Potencial= 50 mV; Sensibilidad 50 nA
  - Electrodo 2: Potencial= 200 mV; Sensibilidad 20 nA
- Módulo de control: coulochem II (ESA)
- Sistema de software Biocrom 2000 (Micron analítica S.A.) para la transformación de la señal analógica a digital y el posterior análisis matemático.

#### - Fase móvil

Independientemente del sistema de detección utilizado la fase móvil fue siempre la misma.

- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (100 mM)
- EDTA (0,1 mM)
- 1-octanosulfonato sódico (0,4 mM)
- 6 % Acetonitrilo

El pH se ajustó a 3,1 con NaOH (10 N).

**- Procesamiento de las muestras**

Una vez descongeladas, las retinas se sonicaron en la solución de ácido perclórico, en la que se habían conservado, a 50 w de potencia, salida 70 %, durante 15 segundos (3 pulsos de 5 segundos). Tras la sonicación, las muestras se centrifugaron a 15000 g durante 3 minutos para precipitar las proteínas del tejido. El sobrenadante resultante se filtró e inyectó en el sistema de HPLC para la cuantificación del contenido de 5OHTrp, dopamina y serotonina. El precipitado se utilizó para la cuantificación de proteínas.

Previamente a la inyección de las muestras se inyectó una curva estándar. Así mismo, durante el análisis de las muestras, se intercalaron estándares cada 10 muestras para controlar los posibles cambios en el tiempo de retención de los compuestos y las posibles variaciones de sensibilidad del detector.

**d) Análisis de los resultados**

Las áreas obtenidas tras la integración de los picos del cromatograma fueron transformadas en pmol/ml utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (pmol/ml)} = (\text{Área}_{\text{compuesto}} - A)/B \times (\text{SI} / \text{Área}_{\text{isoproterenol}})$$

A= punto de corte con el eje de abscisas de la recta de calibración

B= pendiente de la recta de calibración

SI= media aritmética del isoproterenol en los estándares.

La concentración de los distintos compuestos de una muestra expresada en pmol/retina se obtuvo tras aplicar:

$$\text{Concentración (pmol/retina)} = \text{Concentración (pmol/ml)} \times V_s$$

$V_s$  = Volumen de sonicación de cada retina expresado en ml

Con el detector coulométrico este volumen fue 80  $\mu$ l (0,08 ml).

Con el detector amperométrico este volumen fue 120  $\mu$ l (0,12 ml).

Finalmente, la concentración expresada en pmol/mg de proteínas se obtuvo utilizando:

$$\text{Concentración (pmol/mg prot)} = \text{Concentración (pmol/retina)} / (\text{mg prot/retina})$$

Los cálculos anteriores se aplicaron para hallar el contenido de 5OHTrp, dopamina y serotonina.

Para hallar la actividad TPH, a los datos individuales del contenido de 5OHTrp expresado en pmol/mg prot. se les restó la media aritmética del contenido de 5-OHTrp del grupo blanco y se expresó por hora.

#### **2.4.1.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH *IN VIVO***

La determinación de la actividad TPH *in vivo* se realizó siguiendo la técnica descrita por Carlsson y colaboradores en 1972 para cerebro y posteriormente modificada por Thomas e Iuvone en 1991 para la retina de pollo. Al igual que ocurría para la valoración de la actividad *in situ*, esta técnica se basa en la inhibición de la AAAD utilizando mHBH, y la consiguiente acumulación de 5OHTrp. Sin embargo, en este caso la administración de mHBH se realiza mediante inyección intraperitoneal. El tiempo cero de la reacción es el momento de la inyección y el tiempo de reacción es el tiempo que transcurre hasta el sacrificio del animal.

Excepto para los experimentos de dosis-respuesta del mHBH, los animales se pesaron y se les inyectó el volumen de solución de mHBH necesario para ajustar la dosis de mHBH a 100 mg/Kg de peso corporal. En todos los casos, el volumen de inyección fue de alrededor de 200  $\mu$ l. Excepto para los experimentos de desarrollo temporal, el tiempo de reacción fue de 30 minutos. Transcurrido este tiempo, el animal se decapitó y las retinas neurales se extrajeron siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 2.2.

La valoración del contenido de 5OHTrp se realizó por HPLC siguiendo el procedimiento anteriormente descrito (apartado 2.4.1.1.c).

#### **2.4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEROTONINA-N-ACETILTRANSFERASA**

##### **a) Fundamento del ensayo.**

La actividad NAT fue medida utilizando un ensayo basado en la formación de N-acetiltriptamina (NAcTr) a partir de triptamina y acetyl-CoA y consiguiente valoración de este

producto por HPLC con detección amperométrica siguiendo el método descrito por Thomas y colaboradores en 1990.

### **b) Reactivos**

#### **- Tampón fosfato 250 mM**

- $K_2HPO_4$  (250 mM)
- $KH_2PO_4$  (250 mM)
- pH 6,5

Tras preparar un mismo volumen de las dos sales por separado y la completa disolución de las misma, el pH de la solución se ajustó añadiendo la cantidad necesaria de la forma básica ( $K_2HPO_4$ ) a la forma ácida ( $KH_2PO_4$ ).

#### **- Mezcla tolueno:alcohol isoamilo**

- 1 ml de HCl 1N
- 3 ml de alcohol isoamilo
- 396 ml de tolueno

Mezclar primero el HCl y el alcohol isoamilo, agitar y añadir el tolueno. Mantener a 4°C.

### **c) Procedimiento**

Tras la extracción de la retina neural, el tejido se sonicó en 150  $\mu$ l de tampón fosfato (250 mM, pH 6,5) que contenía 1,33 mM de acetil-CoA. Una alícuota de 75  $\mu$ l del homogeneizado se utilizó para la reacción, la cual comenzó al añadir 25  $\mu$ l de una solución 8 mM de triptamina. Las concentraciones finales de los sustratos en el ensayo son 2 mM de triptamina y 1 mM de acetilCoA. Tras incubar 15 minutos a 25°C en un baño termostatzado, la reacción se paró añadiendo 1 ml de la mezcla de tolueno:alcohol isoamilo a 4°C. Para los tubos blancos, los 75  $\mu$ l del homogeneizado se sustituyeron por 75  $\mu$ l de la solución de acetil-CoA (1,33 mM).

Una vez parada la reacción se procede a la extracción del producto de la misma, la NAcTr. Tras agitar 3 veces durante 30 segundos, las muestras se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos a 4°C. 500  $\mu$ l de la fase superior (orgánica) se transfieren a un nuevo tubo de ensayo y se evaporaron con nitrógeno a temperatura ambiente. El residuo seco se reconstituyó en 100  $\mu$ l de fase móvil, inyectándose 15  $\mu$ l en el sistema de HPLC. Para calcular la eficacia de la extracción

se extrajeron 75  $\mu\text{l}$  de NAcTr (4  $\mu\text{M}$ ), que coincide con la concentración mas alta de la curva estándar, completándose el volumen de reacción con 25  $\mu\text{l}$  de la solución de triptamina.

#### d) Detección electroquímica de la N-acetiltriptamina

El sistema de HPLC utilizado para la cuantificación de la NAcTr consta de los siguientes elementos:

- Bomba peristáltica Bromma LKB. Flujo: 1,5 ml/min.
- Inyector automático Gilson 231
- Columna de cromatográfica Whatman partisphere C18. Tamaño de partícula: 5  $\mu\text{M}$ ; Longitud: 11 cm; diámetro externo 7,94 mm; diámetro interno 4,7 mm.
- Detector amperométrico (Princeton Applied Research, 410) Potencial: 900 mV.  
Sensibilidad: 100 nA

La composición de la fase móvil fue:

- Ácido fosfórico (50 mM)
- 1-Octanosulfonato sódico (1,5 mM)
- 33 % Metanol

El pH se ajustó a 3,1 con NaOH (10 N).

#### e) Análisis de los resultados

En cada experimento, previamente a la inyección de las muestras, se inyectó una curva estándar que se utilizó para la calibración. De este modo, el área obtenida tras la integración del pico del cromatograma correspondiente a la NAcTr fue transformado en pmol/ml utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{NAcTr (pmol/ml)} = (\text{Área}_{\text{NAcTr}} - A)/B$$

A= punto de corte con el eje de abscisas de la recta de calibración

B= pendiente de la recta de calibración

La actividad NAT expresada como pmol/min/retina se obtienen tras aplicar:

$$\text{NAT(pmol/min/retina)} = (\text{NAcTr}_{\text{pmol/ml(muestra)}} - \text{NAcTr}_{\text{pmol/ml(blanco)}}) \times C \times V/15$$

$$C = (\text{pmol/ml})_{\text{no extraído}} / (\text{pmol/ml})_{\text{extraído}} \times 0,75/2$$

$$V = V_r \times (V_s/V_e) \times (V_p/V_{\text{ext}})$$

$V_r$  = Volumen de reconstitución expresado en ml

$V_s$  = Volumen de sonicación expresado en  $\mu\text{l}$ .

$V_e$  = Volumen de muestra utilizado en el ensayo expresado en  $\mu\text{l}$ .

$V_p$  = Volumen de tolueno utilizado para parar la reacción expresado en ml

$V_{\text{ext}}$  = Volumen utilizado para la extracción expresado en ml.

El factor 15 es la corrección para expresar la actividad enzimática por minuto.

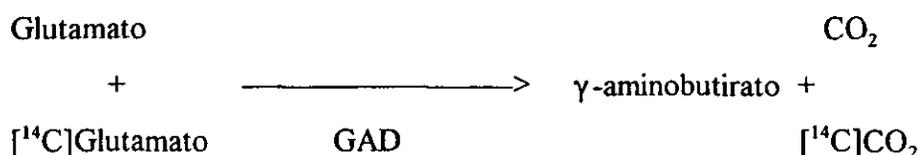
La actividad enzimática expresada como pmol/min/mg proteína se calcula utilizando:

$$\text{NAT}(\text{pmol/min/mg prot}) = \text{NAT}(\text{pmol/min/retina}) / (\text{mg prot/retina})$$

### 2.4.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESCARBOXILASA (GAD)

#### a) Fundamento del ensayo

La actividad glutamato descarboxilasa fue medida utilizando un radioenzim ensayo propuesto por primera vez por Albers y Brandy en 1959 para el cerebro de mono, y modificado posteriormente por Zawilska e Iuvone en 1992 para la retina de pollo. Esta técnica se basa en capturar el  $\text{CO}_2$  liberado durante la reacción de descarboxilación:



#### b) Reactivos

##### - Tampón fosfato 250 mM, pH 6,5

. Véase apartado 2.4.2 de esta memoria

##### - Preparación de los filtros fijadores de $\text{CO}_2$

. Colocar tiras enrolladas de unos 22 cm de longitud y 8 mm de anchura de papel Whatman P81 en los portafiltros de los tapones de los tubos de reacción.

. Empapar los filtros con 100  $\mu\text{l}$  de Protosol

**- Mezcla de reacción**

- . 0,39  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol / ml Triton X-100 (2,5%)
- . Fosfato de piridoxal (0,73 mg/ml).
- . Ácido glutámico 12,3 mM (2,3 mg/ml). Disolver en agua

Tras disolver el fosfato de piridoxal en la solución de  $\beta$ -mercaptoetanol-Triton, se preparó la mezcla de reacción manteniendo las siguientes proporciones por cada tubo de ensayo:

- 3  $\mu$ l (0,15  $\mu$ Ci) de L-[1- $^{14}$ C] ácido glutámico
- 12  $\mu$ l de la solución de ácido glutámico
- 10  $\mu$ l de la solución de fosfato de piridoxal

**c) Procedimiento**

Tras la extracción de la retina neural, el tejido se sonicó en 150  $\mu$ l de tampón fosfato (250 mM, pH 6,5) y una alícuota de 25  $\mu$ l se trasvasó a tubos de vidrio de 15 ml. La reacción comenzó con la adición de 25  $\mu$ l de la mezcla de reacción, e inmediatamente los tubos se taparon alojando en su interior el filtro fijador de CO<sub>2</sub>. La incubación fue de 20 minutos a 25°C utilizando un baño termostatzado con agitación. La reacción finalizó al inyectar en el tubo 0,5 ml de ácido tricloroacético al 20 % con cuidado de no tocar el filtro fijador de CO<sub>2</sub>. La incubación se continuó durante otros 90 minutos para asegurarse de que todo el CO<sub>2</sub> producido durante la reacción ha sido capturado por el filtro. Finalmente, el filtro se transfiere a un vial de centelleo añadiendo 4 ml de una mezcla de líquido de centelleo (Ecolume):metanol (9:1). Contar las DPM del  $^{14}$ C utilizando un contador de centelleo  $\beta$ . Para los tubos blancos, los 25  $\mu$ l del homogeneizado se sustituyeron por 25  $\mu$ l del tampón de sonicación.

**d) Cuantificación**

La actividad enzimática por retina se obtiene aplicando:

$$\text{GAD (pmol/min/retina)} = ((\text{DPM}_{\text{muestra}} - \text{DPM}_{\text{blanco}}) / \text{DPM}_{\text{totales}}) \times \text{pmol}_{\text{totales}} \times (\text{Vs}/\text{Ve}) / 20$$

Vs = Volumen de sonicación expresado en  $\mu$ l.

Ve = Volumen de muestra utilizado para el ensayo expresado en  $\mu$ l.

El factor 20 es el corrector de tiempo para expresar la actividad por minuto.

La actividad por mg de proteína se calcula utilizando:

$$\text{GAD (pmol/min/mg prot)} = \text{GAD (pmol/min/retina)} / (\text{mg prot/retina})$$

#### 2.4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE AMP CÍCLICO

##### a) Fundamento del ensayo

La acumulación de cAMP se valoró determinando la síntesis de [<sup>3</sup>H]cAMP en células premarcadas con [<sup>3</sup>H]adenina según el método descrito por Shimizu *et al.* (1969).

##### b) Reactivos

###### - Preparación de las columnas cromatográficas

###### Columnas de Dowex

- Columnas de polipropileno Disposaflex de 8 mm x 200 mm.
- Resina Dowex-50W-X4 (200-400 mesh)

Tras lavar la resina Dowex-50W-X4 diez veces con H<sub>2</sub>O, (proporción 1:1 resina:H<sub>2</sub>O, volumen) se añadió la mezcla (1:1 con H<sub>2</sub>O) a las columnas hasta alcanzar una altura de 3 cm de resina una vez drenada. Previamente a la adición de las muestras de un ensayo, las columnas de Dowex se lavaron con 10 ml de agua destilada.

###### Columnas de alúmina

- Columnas de polipropileno Disposaflex de 8 mm x 200 mm.
- Alúmina (Neutra Tipo WN-3)

Tras lavar la alúmina diez veces con H<sub>2</sub>O, se secó a 60°C añadiéndose 0,6 g. a cada columna. Previamente a la adición de las muestras de un ensayo las columnas se lavaron con 10 ml de tampón Tris-HCl 50 mM.

###### - TRIS-HCl 50 mM pH 8,0

- Trizma base (50 mM)

Ajustar el pH a 8,0 con HCl (10 N).

###### - Solución de cAMP portador

Disolver cAMP (4 mM) en agua destilada

###### - Estándar interno de <sup>14</sup>C-cAMP

Preparar una dilución 1:500 y conservar en alícuotas a -20°C.

### c) Procedimiento

Las copas ópticas se cultivaron en 1 ml de la SC suplementada con 4  $\mu$ l de  $^3\text{H}$ -Adenina (4  $\mu\text{Ci/pocillo}$ ) durante 4 horas. Tras este tiempo de marcaje, las copas ópticas se lavaron en 50 ml de SC y se traspararon a un nuevo pocillo con SC sin adenina tritiada y con los fármacos correspondientes. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, tras los cuales se extrajo la retina neural y se sumergió en 300  $\mu$ l de ácido tricloracético al 10%.

Para la extracción del cAMP, a todos los tubos se añadieron 10  $\mu$ l de cAMP (4 mM) como portador y 6  $\mu$ l del estándar interno de  $^{14}\text{C}$ -cAMP. Los tubos blancos se prepararon según el procedimiento descrito pero sin añadir la retina neural. Tras la sonicación del tejido, las muestras se centrifugaron a 17000 g durante 5 min a 4°C. Una alícuota de 10  $\mu$ l del sobrenadante se traspasó a viales de centelleo para obtener las cuentas totales. Los tubos estándar de las cuentas totales se hicieron pipeteando directamente 6  $\mu$ l del estándar interno de  $^{14}\text{C}$ -cAMP en un vial de centelleo. Los viales de centelleo se completaron con 300  $\mu$ l de agua destilada y 3 ml de líquido de centelleo.

El resto del sobrenadante se añadió a las columnas de Dowex. Una vez drenadas, se eluyeron con 2 ml de agua. Tras drenarse de nuevo, se colocaron sobre las columnas de alúmina y se eluyeron con 4,5 ml de agua. Cuando las columnas de alúmina terminaron de drenar se retiraron las columnas de Dowex y las columnas de alúmina se colocaron sobre viales de centelleo eluyéndose con 2,5 ml de Tris-HCl 50 mM. Tras añadirse 16 ml de líquido de centelleo, se procedió a la cuantificación de las muestras. Las columnas de Dowex se regeneran con 10 ml de HCl (1N) y las de alúmina con 10 ml de Tris-HCl (50 mM).

### d) Cuantificación

La tasa de recuperación de las columnas cromatográficas se obtuvo:

$$\text{Rec} = \frac{\text{Estándar}_{\text{muestras}} \times (V_s/V_c)}{\text{Estándar}_{\text{totales}}}$$

$$\text{Estándar} = \text{CPM } ^{14}\text{C}$$

$V_c$  = Volumen de las muestras añadido a las columnas.

$V_s$  = Volumen de sonicación

El porcentaje de conversión de cAMP de la muestra se calcula a partir de las DPM de  $^3\text{H}$  aplicando:

$$\text{AC}(\%) = (\text{DPM}_{\text{muestra}} - \text{DPM}_{\text{blanco}}) / (\text{DPM}_{\text{totales}} - \text{DPM}_{\text{bl totales}}) / \text{Rec} \times V_s \times 100$$

El factor 100 se aplica para expresar la actividad en %.

## 2.4.5. DETERMINACIÓN DE LA ENTRADA DE CALCIO

### a) Fundamento del ensayo

La captura de calcio por parte de las retinas enriquecidas en fotorreceptores se determinó valorando la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  según el método descrito por Wei *et al.* (1988) para cultivos de neuronas de la retina.

### b) Reactivos

#### • Soluciones madre

- Glucosa (100 mM)
- NaCl (1,25 M)
- KCl (360 mM)
- $\text{CaCl}_2$  (114,4 mM)
- $\text{MgCl}_2$  (120 mM)
- Tris:HCl (0,25 M) pH 7,2

Conservar a  $4^\circ\text{C}$

#### • Tampón Salino-Tris (TST)

La solución TST se preparó siempre antes del experimento a partir de las distintas soluciones madre:

	<u>100 ml</u>	[final]
Glucosa	5 ml	5 mM
NaCl	6,6 ml	82,5 mM
KCl	555 $\mu\text{l}$	2 mM
$\text{CaCl}_2$	874 $\mu\text{l}$	1 mM
$\text{MgCl}_2$	833 $\mu\text{l}$	1 mM
Tris:HCl (0,25)	10 ml	25 mM
$\text{H}_2\text{O}$	76,138 ml	

**c) Procedimiento**

Las copas ópticas se cultivaron en placas de 35 mm conteniendo 5 ml de SC durante una hora. Tras su extracción, las retinas neurales se depositaron en una placa de 35 mm que contenía 5 ml de TST con los fármacos correspondientes y se preincubaron durante 5 minutos. El tiempo de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  fue de 30 segundos durante los cuales, la retina se sumergió en 5 ml de TST suplementado con 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  y los fármacos correspondientes. La captura de calcio se paró lavando 3 veces en 50 ml de TST a 4°C y sumergiendo las retinas en 150  $\mu\text{l}$  de NaOH (0,5 N). Tras sonicar las retinas, se separó una alícuota de 15  $\mu\text{l}$  para la determinación de las proteínas totales. Los 135  $\mu\text{l}$  restantes se trasvasaron a un vial de centelleo y tras añadir 12,5  $\mu\text{l}$  de ácido acético glacial y 6 ml de líquido de centelleo se cuantificó la radiactividad. Para la obtención del blanco se utilizó el mismo procedimiento, excepto que el tiempo de captura fue cero, lavándose la retina inmediatamente después de ser sumergida en TST suplementado con  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Las cuentas totales se determinaron en una alícuota de 125  $\mu\text{l}$  del TST con  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .

**d) Cuantificación**

La captura de  $\text{Ca}^{2+}$  se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Entrada de } \text{Ca}^{2+} \text{ (nmol/mg prot)} = \text{CPM}_{\text{muestra}} / \text{CPM}_{\text{totales}} \times \text{nmol}_{\text{totales}} / \text{mg prot}$$

**2.4.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE PROTEÍNAS****a) Fundamento del ensayo**

Para la determinación del contenido total de proteínas se utilizó una técnica colorimétrica basada en la reacción del grupo alcohol de los residuos de tirosina con el reactivo Folin-Ciocalteu según el método descrito por Lowry *et al.* (1951).

**b) Reactivos****- Tartrato Na-K (2 %)**

- Tartrato NaK            2 g
- H<sub>2</sub>O                        100 ml

**- CuSO<sub>4</sub> (1 %)**

- CuSO<sub>4</sub>                    1 g
- H<sub>2</sub>O                        100 ml

**- Solución B**

- NaOH            1 g
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>        5 g
- H<sub>2</sub>O             250 ml

**- Solución C**

- CuSO<sub>4</sub> (1 %)                    1 ml
- Tartrato Na-K (2 %)            1 ml
- Solución B                        100 ml

Preparar en el momento de usar.

**c) Procedimiento**

Añadir 1,25 ml de la solución C a 250 µl de muestra. Agitar e incubar 15 minutos a 30°C. Añadir 0,25 ml de reactivo Folin:H<sub>2</sub>O (1:1). Agitar e incubar 30 minutos a 30°C. Lectura de la absorbancia a 500 nm

**d) Cuantificación**

Para la transformación de las absorbancias en mg de proteínas se utilizó una curva estándar de un patrón de seroalbúmina bovina (BSA) en el intervalo 5-40 µg. Aplicándose la siguiente fórmula:

$$\text{mg proteína/retina} = (\text{Absorbancia} - A)/B \times (V_s/V_e)$$

A= punto de corte con el eje de abscisas de la curva estándar

B= pendiente de la curva estándar

V<sub>s</sub>= Volumen de sonicación expresado en µl.

V<sub>e</sub>= Volumen de muestra utilizado para el ensayo de proteínas expresado en µl.

**2.4.7. DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS****a) Fundamento de la técnica**

Para la valoración de la síntesis de proteínas utilizamos una modificación del método propuesto por Mans y Novelli en 1961 basado en la incorporación de leucina tritiada a las proteínas recién sintetizadas de un tejido. La incorporación de leucina se cuantificará fijando las proteínas en filtros de papel y cuantificando su radiactividad.

**b) Reactivos**

- Tampón borato (50 mM)

Ácido bórico (50 mM)

El pH se ajustó a 9,0 utilizando NaOH (10 N)

**c) Procedimiento**

Tras cultivar las copas ópticas durante 5 horas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3, se añadió 3  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]leucina (concentración final en el medio de 2  $\mu\text{Ci/ml}$ ), comenzando el marcaje de las proteínas que estaban siendo sintetizadas. El tiempo de marcaje fue de 60 minutos, durante el cual el cultivo se prolongó conservando las condiciones mantenidas durante el periodo de cultivo previo al inicio del marcaje. El marcaje finalizó con la extracción de la retina neural. Una vez extraída, la retina neural se sumergió en 200  $\mu\text{l}$  del tampón borato.

Tras la sonicación del homogeneizado, una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  del mismo se depositó sobre filtros de papel Watman (3MM) de 2,3 cm de diámetro, los cuales se dejaron secar durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez secos, los filtros se depositaron en un vaso de precipitado que contenía una solución de ácido tricloroacético al 10 % a 4°C (5-10 ml por filtro) y se dejaron durante una hora, agitando cada 10 min. Tras decantar la solución de ácido tricloroacético, los filtros se sometieron a una serie sucesiva de lavados con:

- Solución de ácido tricloroacético al 5 % a 4°C durante 20 minutos (2 veces).
- Solución de etanol 95%:eter (1:1) (2-6 ml por filtro) durante 20 minutos a 40°C.
- Eter dietílico (1 ml por filtro) durante 1 minuto a temperatura ambiente (2 veces).

Una vez completados los lavados, los filtros se secaron a temperatura ambiente y se traspasaron a viales de centelleo de 20 ml. Se añadió 700  $\mu\text{l}$  de Protosol y los viales se incubaron a 60°C durante 14 horas. Finalmente, se añadió 10 ml de líquido de centelleo y se contaron los viales en un contador de centelleo  $\beta$ .

**d) Cuantificación**

La síntesis de proteínas se expresó como DPM de [ $^3\text{H}$ ]leucina incorporada por  $\mu\text{g}$  proteína tras aplicar la fórmula:

Síntesis de proteínas (DPM/ $\mu$ g proteína) =  $(\text{DPM}_{[3\text{H}] \text{leucina}} / \mu\text{g prot}_{\text{retina}}) \times (V_s/V_f)$

$V_s$  = Volumen de sonicación.

$V_f$  = Volumen de muestra añadido por filtro.

## 2.4.8. DETERMINACIÓN DEL mRNA DE LAS RETINAS NEURALES

### 2.4.8.1. EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL DEL TEJIDO

#### a) Fundamento del ensayo

Para la extracción del RNA se utilizó el reactivo comercial Trizol. Este reactivo es una solución de fenol e isotiocianato de guanidina, que permite aislar el RNA en un solo paso según la técnica desarrollada por Chomczynski y Sacchi en 1987.

#### b) Procedimiento

Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente excepto las centrifugaciones que tuvieron lugar a 4°C. Cada retina se homogeneizó en 500  $\mu$ l del reactivo Trizol y se incubó durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l de cloroformo, se agitó y se incubó 5 minutos. Tras centrifugar 15 minutos a 7.500 g, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 300  $\mu$ l de isopropanol, incubándose durante 1 hora. Tras centrifugar 10 minutos a 11.000 g, el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 1 ml de etanol al 75%. Tras una nueva centrifugación de 5 minutos a 7.500 g, el sobrenadante se descartó y el precipitado se secó al aire reconstituyéndose en 10  $\mu$ l de agua tratada con DEPC e incubándose 10 minutos a 60°C. Finalmente, la cantidad total de RNA extraído se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm utilizándose una alícuota de 1  $\mu$ l de la muestra.

### 2.4.8.2 ELECTROFORESIS DE mRNA

#### a) Reactivos

##### - Agua tratada con DEPC (DEPC-H<sub>2</sub>O)

- DEPC            0,2 ml
- H<sub>2</sub>O            100 ml

Tras mezclar y agitar vigorosamente, la solución se autoclavó para inactivar el DEPC.

- Tampón de electroforesis pH 5.5

- MOPS (0,02 M)
- Acetato sódico (5 mM)
- EDTA (0,01 M)

- Tampón MOPS (10X), pH 7

- MOPS (0,2 M)
- Acetato sódico (0,05 M)
- EDTA (0,1 M)

El tampón se ajustó a pH 7,0 utilizando NaOH (10 N)

- Solución de trabajo

La solución de trabajo se preparó manteniendo las siguientes proporciones para cada muestra:

- |                           |         |
|---------------------------|---------|
| • Tampón MOPS (10x), pH 7 | 2,5 µl  |
| • Formol                  | 4,5 µl  |
| • Formamida               | 12,5 µl |

- Tampón de carga para RNA

Volumen final	<u>1,5 ml</u>	[final]
• EDTA (0,5 M), pH 8	3 µl	1 mM
• Glicerol	750 µl	50% v/v
• Azul de bromofenol	3,8 mg	0,25% p/v
• DEPC-H <sub>2</sub> O	747 µl	

- Gel de agarosa 1%

- |                                |         |
|--------------------------------|---------|
| • Agarosa                      | 1 g     |
| • Tampón de electroforesis     | 90 ml   |
| • Formol                       | 10,8 ml |
| • Bromuro de etidio (10 mg/ml) | 6 µl    |

Se añadió la agarosa en el tampón de electroforesis y se calentó hasta ebullición. Tras enfriar a 40°C con agitación magnética, se añadió el formol y el bromuro de etidio. La disolución se trasladó a la cubeta de electroforesis y se esperó hasta que se solidificó.

- Tampón de transferencia (SSC)

- NaCl (1,5 M)
- Citrato sódico (0,15 M)

Se ajustó el pH a 7,0 utilizando HCl (1N).

**b) Procedimiento**

Para la preparación de las muestras se trasladó el volumen correspondiente a 4 µg de RNA por muestra a un nuevo eppendorf. Cuando el volumen utilizado fue menor de 5,5 µl se completó hasta dicho volumen con agua tratada con DEPC. Tras añadir 19,5 µl de la solución de trabajo, se incubó a 60°C durante 10 minutos. Finalmente, se añadieron 5 µl del tampón de carga para RNA.

La separación de los distintos RNA se realizó en un gel de agarosa sumergido en el tampón de electroforesis al que se aplicó una corriente de 100 v durante 1 h. Finalmente el RNA se transfirió por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa. El tiempo de transferencia fue de 18 h tras las cuales se comprobó la eficacia del proceso aplicando luz ultravioleta al gel y a la membrana de nitrocelulosa. El RNA se fijó a la membrana incubando a 80°C durante 2 horas. Para comprobar que se ha cargado una misma cantidad de RNA de todas las muestras se realizó una densitometría del rRNA 28S (Applied Imaging Lynx 5.1).

### 2.4.8.3 PREPARACIÓN DE LAS SONDAS DE cDNA

**a) Reactivos**

- Tampón de electroforesis (TBE)

- TRIS (1 M)
- Ácido bórico (89 mM)
- EDTA (2mM)

El pH del tampón se ajustó a 8,0 con NaOH (10 N)

**- Gel de agarosa para la separación de DNA**

• TBE	100 ml
• Agarosa (punto de fusión bajo)	0,8 g
• Bromuro de etidio (10 mg/ml)	6 $\mu$ l

Se añadió la agarosa en el TBE y se calentó hasta ebullición. Tras enfriar a 40°C agitando magnéticamente, se añadió el formol y el bromuro de etidio. La disolución se traspasó a la cubeta de electroforesis y se esperó hasta su gelificación.

**- Tampón de carga para DNA**

Volumen final	1,5 ml	[Final]
• TBE	7,5 $\mu$ l	0,5% v/v
• Glicerol	750 $\mu$ l	50% v/v
• Azul de bromofenol	3,8 mg	0,25% p/v
• DEPC-H <sub>2</sub> O	742,5 $\mu$ l	

Conservar en alícuotas a -20°C

**- Solución 1**

Volumen final	200 $\mu$ l	[Final]
• Albúmina sérica bovina (10 mg/ml)	80 $\mu$ l	4 mg/ml
• Promotores aleatorios (3 $\mu$ g/ $\mu$ l)	33,3 $\mu$ l	0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l
• DEPC-H <sub>2</sub> O	86,7 $\mu$ l	

Conservar en alícuotas a -20°C

**- Solución 2**

Volumen final	1 ml	[Final]
• HEPES pH 6,6 (1 M)	0,5 ml	(0,5 M)
• MgCl (1 M)	12 $\mu$ l	(12 mM)
• $\beta$ -mercaptoetanol (12,5 M)	2 $\mu$ l	(25 mM)
• TRIS pH 8 (2 M)	60 $\mu$ l	(12 mM)
• ATP (100 mM)	1 $\mu$ l	(0,1 mM)
• GTP (100 mM)	1 $\mu$ l	(0,1 mM)
• TTP (100 mM)	1 $\mu$ l	(0,1 mM)
• DEPC-H <sub>2</sub> O	423 $\mu$ l	

### b) Procedimiento

La sonda de cDNA de TPH utilizada para los experimentos de esta memoria es el clon de la TPH de *Xenopus laevis* pTPH381 aislado en el laboratorio de los doctores Besharse y Green y que fue cedida amablemente por los mismos. El cDNA de la TPH fue enviado a nuestro laboratorio insertado en un plásmido. Para la extracción del cDNA de la TPH, 15 µg de plásmido se incubaron con 15 µg de las enzimas de restricción XhoI, XbaI y Hind III a 37°C durante 1 hora. La separación de los distitos fragmentos de DNA obtenidos se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % sumergido en TBE aplicando un voltage de 100 v durante 40 minutos. La sonda de la actina humana utilizada fue de origen comercial.

El marcaje de las distintas sondas con  $^{32}\text{P}$  se realizó por polimerización aleatoria utilizando el siguiente procedimiento. Tras desnaturalizar la sonda de cDNA incubando durante 5 minutos a 100°C se añadieron 5 µl de la solución 1, 20 µl de la solución 2, 1 µl de Klenow y 5 µl de  $^{32}\text{P}$ -dCTP incubándose a 37°C durante 2 horas. La reacción se paró añadiendo 20 µl de EDTA (0,5 M, pH 8). La cantidad de radioactividad incorporada durante la reacción se valoró precipitando 1 µl de la sonda marcada con 5 ml de ácido tricloroacético. La radiactividad incorporada fue aproximadamente  $10^7$  CPM.

#### 2.4.8.4 HIBRIDACIÓN DEL mRNA

##### a) Reactivos

##### - Tampón de hibridación

Volumen final	800 ml
• Sulfato de dextrano	80 g
• Formamida	320 ml
• SSC	320 ml
• TRIS 2M, pH 7,4	8 ml
• Solución de Denhardt	8 ml
• DNA de espermatozoos de salmon (ssDNA)	20 µg
• DEPC-H <sub>2</sub> O	156 ml

Filtrar y conservar a 4°C.

**- Solución de Denhardt**

- Polivinilpirrolidona            2% p/v
- Albúmina sérica bovina        2% p/v
- Ficoll 400                        2% p/v

Disolver todos los compuestos en agua, filtrar y conservar a -20°C en alícuotas de 25 ml

**- Tampón STRIP**

- |                                |        |         |
|--------------------------------|--------|---------|
| Volumen final                  | 500 ml | [Final] |
| • EDTA (0,5 M), pH 8,00        | 2 ml   | (2 mM)  |
| • SDS (10%)                    | 5 ml   | (0,1%)  |
| • H <sub>2</sub> O autoclavada | 493 ml |         |

**- Solución 3**

- |                    |        |
|--------------------|--------|
| Volumen final      | 100 ml |
| • SSC              | 20 ml  |
| • SDS (10%)        | 1 ml   |
| • H <sub>2</sub> O | 79 ml  |

**- Solución 4**

- |                    |        |
|--------------------|--------|
| Volumen final      | 100 ml |
| • SSC              | 1 ml   |
| • SDS (10%)        | 1 ml   |
| • H <sub>2</sub> O | 98 ml  |

**b) Procedimiento**

Para la hibridación de los distintos mRNA, 150 µl de ssDNA se diluyeron con 150 µl de agua tratada con DEPC y se desnaturalizaron incubándose a 100°C durante 5 minutos. Tras enfriarse rápidamente a 4°C se mezcló con 10 ml del tampón de hibridación y se trasvasó a un tubo de hibridación que contenía la membrana de nitrocelulosa previamente humedecida en el tampón STRIP. Se incubó a 42°C durante 2 horas en rotación constante. Finalizada la prehibridación, 150 µl de ssDNA se mezclaron con la sonda marcada y se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos, tras los cuales se mezclaron con 10 ml de nuevo tampón de hibridación.

El tampón de prehibridación se cambió por el nuevo tampón de hibridación conteniendo la sonda, y la hibridación tuvo lugar incubándose a 42°C durante 18 h en rotación constante. Finalizado el tiempo de hibridación, la membrana se lavó 2 veces con la solución 3 a temperatura ambiente durante 15 minutos y otras 2 veces con la solución 4 a 52°C durante 15 minutos. Tras el secado de la membrana a 60°C durante 30 minutos, se expuso a la pantalla de fosforradiografía durante 4 horas y se realizó el escáner de la misma.

### **2.5. MICROSCOPIA ÓPTICA, PREPARACIONES HISTOLÓGICAS**

Tras la extracción de los ojos, se sumergieron en el compuesto de inclusión LX112 (Ladd Research Industries). Tras la inclusión se realizaron secciones de 1,5 µm que fueron teñidas con azul de toluidina.

El registro de la imagen de los cortes histológicos de la retina se realizó utilizando un microscopio conectado a un sistema de captura de imagen. Sobre las imágenes capturadas se realizó el análisis morfométrico utilizando el programa Image Tool.

## **3. DISEÑOS EXPERIMENTALES**

Para la especificación del fotoperiodo en los distintos diseños experimentales se usará la nomenclatura utilizada en la literatura científica, indicando en primer lugar la duración de la fase luminosa en horas seguido de la letra L, y a continuación la fase oscura seguido de la letra D. Ambas fases se separan por dos puntos. Ejemplo 12L:12D. Así mismo, todas las horas se especifican de acuerdo con el ciclo de luz en el que se mantuvieron los animales, considerando el momento de encendido de la luz como tiempo circadiano 0 (ZT0). Según esta nomenclatura con un fotoperiodo 12L:12D, la mitad de la fase luminosa coincide con el ZT6, el inicio de la fase oscura con el ZT12 y la mitad de la fase oscura con el ZT18.

Como ya hemos indicado anteriormente (véase apartado 1.3), los animales utilizados en todos los experimentos de esta memoria eran mantenidos en condiciones estándares de fotoperiodo (12L:12D) y temperatura (22±1°C) durante un periodo mínimo de 2 semanas antes de su utilización. A esta fase la denominaremos fase de estandarización. Si no se indica lo contrario, cada grupo experimental constó de 6 retinas.

### **3.1. LESIONES OCULARES**

#### **3.1.1. EFECTO DEL ÁCIDO KAÍNICO**

Para los experimentos de dosis-respuesta del KA, una vez concluida la fase de estandarización, los animales eran inyectados intraocularmente en el ojo derecho con salino y en el ojo izquierdo con las distintas dosis del neurotóxico, excepto para el grupo control cuyos animales recibían salino en ambos ojos (Esquema 6). Las inyecciones tenían lugar durante la última hora de la fase luminosa del fotociclo.

Una semana después, los animales eran decapitados en la mitad de la fase oscura (ZT18). Tras la preparación de la copa óptica, la retina neural era extraída y sumergida en 150 µl de tampón fosfato 250 mM pH 6,5 congelándose inmediatamente sobre hielo seco. Las muestras se mantenían congeladas a -80°C hasta el momento de la determinación de las actividades enzimáticas, NAT y GAD.

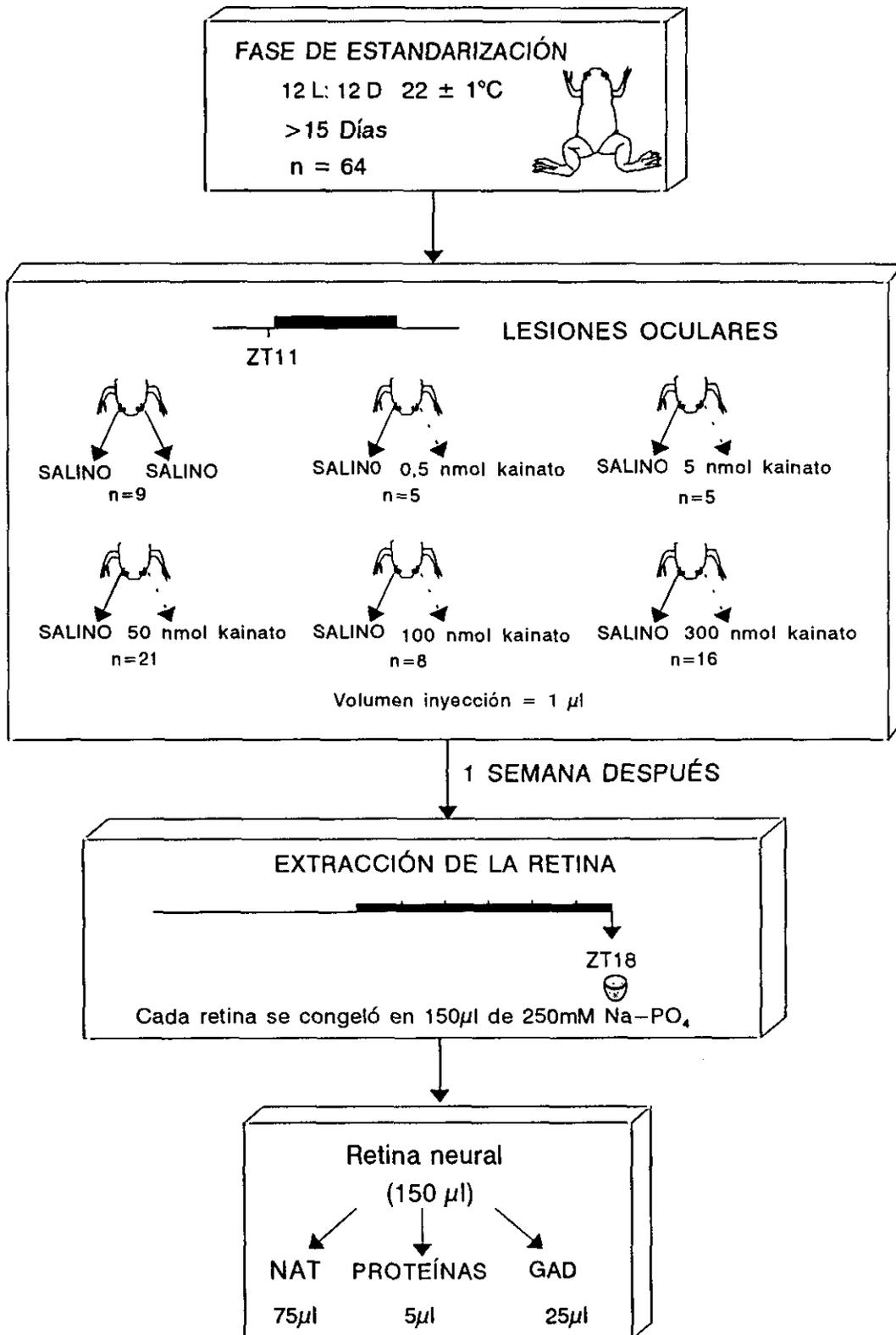
#### **3.1.2. LISIS CON TRITON X-100**

Una vez concluida la fase de estandarización los animales eran decapitados al final de la fase luminosa (ZT11). Tras la extracción del ojo y la preparación de la copa óptica, se procedía a la lesión con Triton X-100. Al término de la lesión ocular, la supuesta capa de fotorreceptores era extraída y sumergida en 150 µl de tampón fosfato 250 mM pH 6,5 congelándose inmediatamente sobre hielo seco. Las muestras se mantenían congeladas a -80°C hasta el momento de la determinación de las actividades enzimáticas, NAT y GAD.

### **3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH *IN SITU***

#### **3.2.1. COPAS ÓPTICAS INTACTAS**

En todos los experimentos de este apartado, una vez finalizada la fase de estandarización los animales se decapitaban al final de la fase luminosa (ZT11) y las copas ópticas se preparaban para el cultivo según el procedimiento explicado en el apartado 2.2. El cultivo se realizaba en SC suplementado con 1 mM de L-Trp durante 3 horas en oscuridad durante la noche subjetiva del animal. Así mismo, excepto para el experimento de desarrollo temporal de la reacción, el tiempo de reacción fue siempre de 60 minutos y la concentraciones de L-Trp y mHBH



**Esquema 6:** Diseño del experimento de la dosis-respuesta de la inyección intraocular de ácido káimico en *Xenopus laevis* sobre los marcadores enzimáticos NAT y GAD.

durante la reacción fueron 1 mM y 10  $\mu$ M respectivamente. Al término de la reacción las retinas neurales fueron extraídas y conservadas según lo explicado en el apartado 2.4.1.

### **3.2.2. COPAS ÓPTICAS LESIONADAS CON KAINATO**

Una vez finalizada la fase de estandarización los animales eran inyectados intraocularmente en ambos ojos con 50 nmol/ojo de KA, realizándose las inyecciones durante la última hora de la fase luminosa (ZT11).

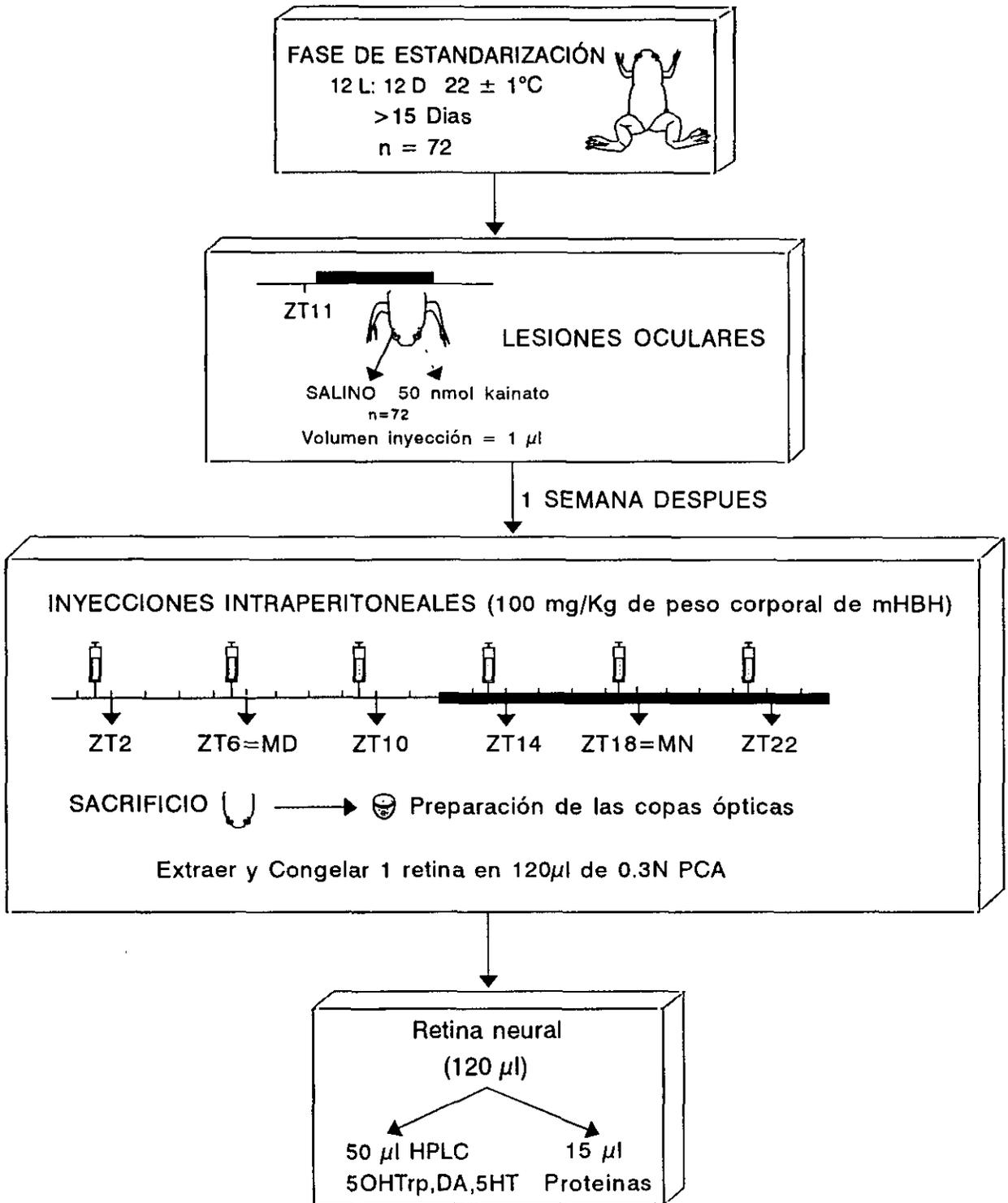
Una semana después, los animales se decapitaron al final de la fase luminosa (ZT11) y las copas ópticas se preparaban para el cultivo según el procedimiento explicado en el apartado 2.2. Si no se indica lo contrario, los experimentos de este apartado se realizaron en medio SC (L-Trp 25  $\mu$ M) cultivándose durante 3 horas en oscuridad durante la noche subjetiva del animal. Durante el tiempo de reacción (30 minutos), el medio se suplementó con 250  $\mu$ M de L-Trp y 10  $\mu$ M de mHBH. Al término de la reacción la retina se extrajo según lo explicado en el apartado 2.4.1.

## **3.3. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH**

### **3.3.1. REGULACIÓN POR FACTORES EXÓGENOS: EFECTO DEL FOTOPERIODO**

En este diseño experimental, una vez concluida la fase de estandarización los animales fueron inyectados intraocularmente en el ojo derecho con salino y en el izquierdo con 50 nmol/ojo de KA, realizándose las inyecciones durante la última hora de la fase luminosa (ZT11) (Esquema 7).

Una semana después, los sapos fueron inyectados intraperitonealmente con mHBH (100 mg/kg de peso corporal) y sacrificados a los 30 minutos. Se extrajo inmediatamente la retina neural y se congeló en 120  $\mu$ l de ácido perclórico 0,3 N con EDTA (0,4 mM), metabisulfito (0,4 mM) y 25 pmol/ml de isoproterenol. Este procedimiento se realizó en los siguientes puntos del ciclo diario: ZT2, ZT6, ZT10, ZT14, ZT18 y ZT22, utilizándose 8 animales por punto. En los puntos de la fase oscura del fotociclo (ZT14, ZT18 y ZT22), todas las manipulaciones se hicieron en completa oscuridad ayudados de una débil luz roja (filtro Kodac nº 92).



**Esquema 7:** Diseño del experimento para determinar el ritmo de la actividad TPH en retinas intactas y lesionadas con 50 nmol de KA de *Xenopus laevis*.

Los parámetros valorados por HPLC fueron el contenido de 5-OHTrp, y por tanto, la actividad TPH, el contenido de dopamina y de serotonina, utilizándose estos dos últimos compuestos como marcadores de la lesión ocular.

### **3.3.2. REGULACIÓN POR SEGUNDOS MENSAJEROS Y NEUROTRANSMISORES RETINIANOS**

En los experimentos de este apartado una vez finalizada la fase de estandarización los animales eran inyectados intraocularmente en ambos ojos con 50 nmol/ ojo de KA, realizándose las inyecciones durante la última hora de la fase luminosa (ZT11) (Esquema 8). Una semana después, los animales se sacrificaron al final de la fase luminosa (ZT11) y las copas ópticas se preparaban para el cultivo según el procedimiento explicado en el apartado 2.2. Dependiendo del parámetro a medir, se utilizó cada uno de los siguientes protocolos:

#### **a) Actividad TPH**

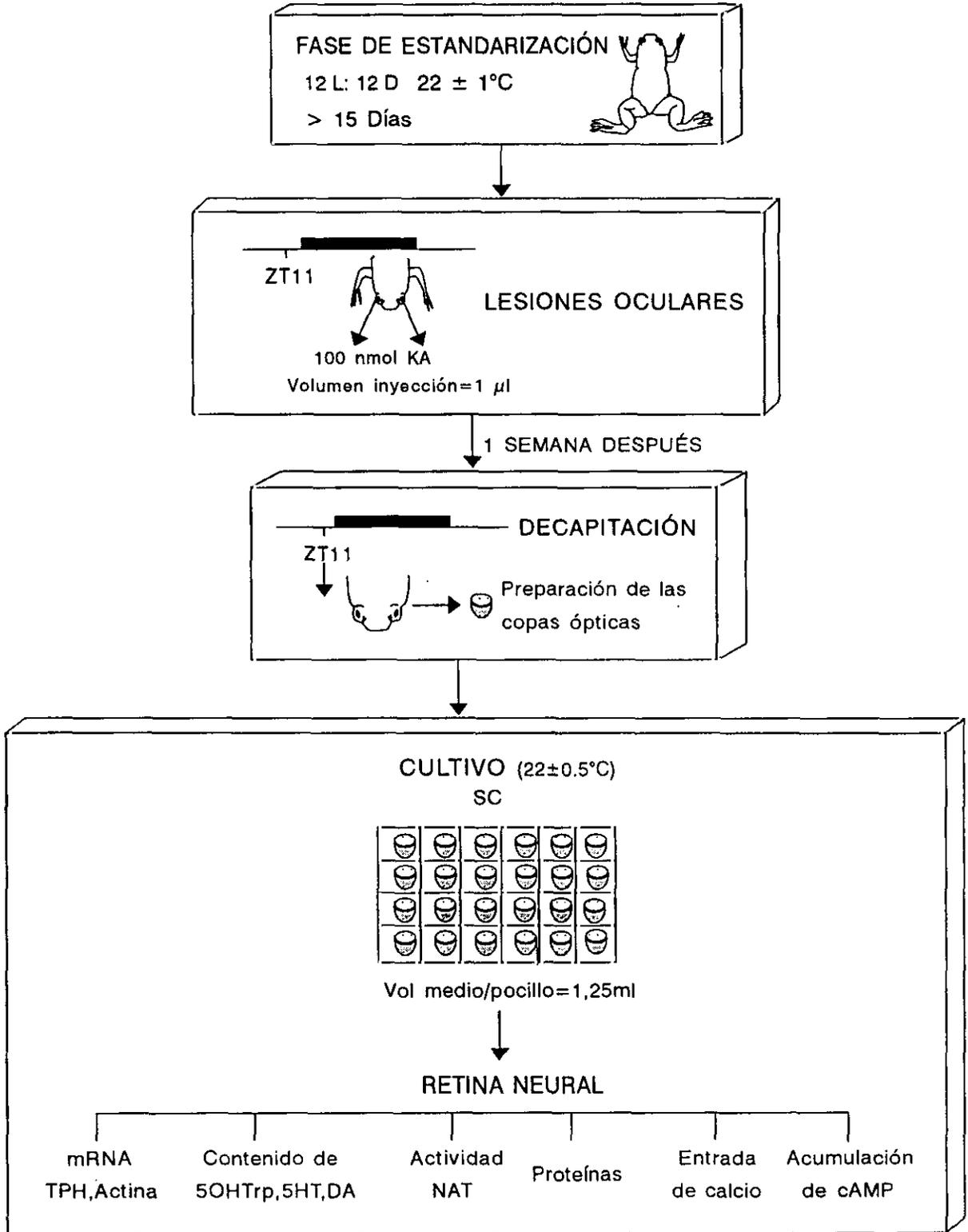
El cultivo se realizó en medio SC (L-Trp 25  $\mu$ M) suplementado con los distintos fármacos durante 4 horas en luz u oscuridad, según se indique en los experimentos concretos. Durante los 30 minutos de reacción el medio se suplementó con 62,5  $\mu$ M de L-Trp y 10  $\mu$ M de mHBH. Al término de la reacción se extrajo la retina congelándose en 120  $\mu$ l de una solución de ácido perclórico (0,3N), EDTA (0,4 mM), metabisulfito sódico (0,4 mM) y 25 pmol/ml de isoproterenol.

#### **b) Actividad NAT**

El cultivo se realizó en medio SC (L-Trp 25  $\mu$ M) suplementado con los distintos fármacos durante 6 horas en luz u oscuridad, según se indique en los experimentos concretos. Al término del tiempo de cultivo, la retina neural se extrajo, congelándose en 150  $\mu$ l de tampón fosfato 250 mM.

#### **c) Contenido de mRNA**

El cultivo se realizó en medio SC (L-Trp 25  $\mu$ M) suplementado con los distintos fármacos durante 6 horas en luz u oscuridad, según se indique en los experimentos concretos. Al término del tiempo de cultivo, la retina neural se extrajo, congelándose en seco.



**Esquema 8:** Diseño de los experimentos de farmacología realizados en esta memoria para el estudio de la regulación de la síntesis de melatonina en la retina de *Xenopus laevis*.

**d) Síntesis de proteínas**

El cultivo se realizó en medio SC (L-Trp 25  $\mu\text{M}$ ) suplementado con los distintos fármacos durante 5 horas en luz. Finalizado este tiempo, se añadió la leucina tritiada siendo el tiempo de marcaje de 60 minutos. Al término del marcaje, la retina se extrajo, conservándose en 200  $\mu\text{l}$  de tampón borato.

**e) Acumulación de cAMP**

El cultivo se realizó en medio SC (L-Trp 25  $\mu\text{M}$ ) suplementado con [ $^3\text{H}$ ]adenina durante 4 horas en luz o en oscuridad, según se indique en los experimentos concretos. Al término de este tiempo, la retina se lavó y se trasvasó a medio SC sin adenina tritiada y con los distintos fármacos. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, al término de los cuales la retina neural se procesó según lo explicado en el apartado 2.4.4, conservándose en 300  $\mu\text{l}$  de tricloroacético al 10%.

**f) Entrada de calcio**

Las copas ópticas se cultivan en SC (L-Trp 25  $\mu\text{M}$ ) durante una hora. Tras extraerse la retina neural, ésta se preincuba durante 5 minutos en TST con los fármacos correspondientes. A continuación, se determinó la captura de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  durante 30 segundos trasvasando la retina al TST suplementado con  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  y los fármacos correspondientes. La retina se conservó en 150  $\mu\text{l}$  de NaOH (0,5 M). En estos experimentos se utilizaron 7 retinas por grupo experimental.

**4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Los análisis estadísticos de esta memoria se llevaron a cabo utilizando el programa informático SigmaStat.

**4.1. ANÁLISIS DE LA VARIANZA**

Para el análisis estadístico de los datos experimentales, se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA). Para la aplicación del ANOVA son requisitos indispensables que los datos de cada uno de los distintos grupos experimentales muestren una distribución normal y que las varianzas de todos los grupos sean homogéneas. Por tanto, previamente a su aplicación deben llevarse a cabo las pruebas estadísticas apropiadas para demostrar ambos supuestos. La normalidad de las distribuciones se comprobó aplicando el test de Kolmogorov-Smirnov. Para determinar la

homogeneidad de las varianzas se analizó la variabilidad entre los grupos de medias. En todos los casos, nuestros datos pasaron ambos tests, considerándose que había diferencias entre los distintos grupos cuando el nivel de significación del ANOVA fue menor de 0,05.

Hay que considerar, que el ANOVA permite averiguar si existen o no diferencias debidas a los distintos tratamientos pero no nos indica qué grupos son distintos entre sí, ni la magnitud de esas diferencias, siendo los análisis *post hoc* de comparaciones múltiples los que permiten aislar y cuantificar esas diferencias. Por tanto, en los casos en los que el nivel de significación del ANOVA fue  $p < 0,05$ , se aplicó el test de Student-Newman-Keuls. Este test permite realizar comparaciones de todos los grupos entre sí basándose en un modelo matématico de la probabilidad de la estructura de las comparaciones múltiples. Tras la aplicación del test de Student-Newman-Keuls se consideró que dos grupos eran significativamente distintos cuando se obtuvo una  $p < 0,05$ . Los niveles de significación se indican en el texto y las figuras utilizando letras: las minúsculas indican el nivel  $p < 0,05$  y las mayúsculas el nivel  $p < 0,01$ .

#### **4.2. ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL**

Para el análisis de los estudios de linealidad temporal de las reacciones enzimáticas y las concentraciones-respuesta de los sustratos de la reacción se utilizó un análisis de regresión lineal, calculándose el coeficiente de correlación  $r$  de Pearson.

#### **4.3. MODELO SINUSOIDAL**

El ritmo de actividad TPH, tanto en retinas intactas como lesionadas con KA, se ajustó a una función cíclica de tipo sinusoidal. Se utilizó el metodo de Duggleby (1981) para ajustar los datos experimentales al modelo:

$$y = A_0 + A_1 \times \cos(t \times \pi / 12 - \varphi)$$

Los parámetros estimados fueron:

- $A_0$ : Nivel medio o mesor. Indica la media de los datos ajustada al ritmo sinusoidal.
- $A_1$ : Amplitud sinusoidal. Indica la oscilación de la función sinusoidal a partir del valor de  $A_0$ .
- $\varphi$ : Fase. Indica el desplazamiento de la curva sinusoidal respecto al origen, su valor coincide con el momento del máximo nocturno.

El tiempo (t) que se representa en horas debe ser transformado a radianes para introducirlo en el modelo. El periodo de la curva sinusoidal, en nuestro caso, toma el valor de 24 horas (24 horas =  $2\pi$  radianes).

Para determinar si el ritmo es significativo, se utilizó la razón señal ruido como estadístico. Cuando este parámetro es menor que 0,3 se considera que la existencia del ritmo es significativa (Halberg y Reinberg, 1967). El coeficiente ruido/señal se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Error estándar}(A_1)/A_1$$

## **IV. RESULTADOS**

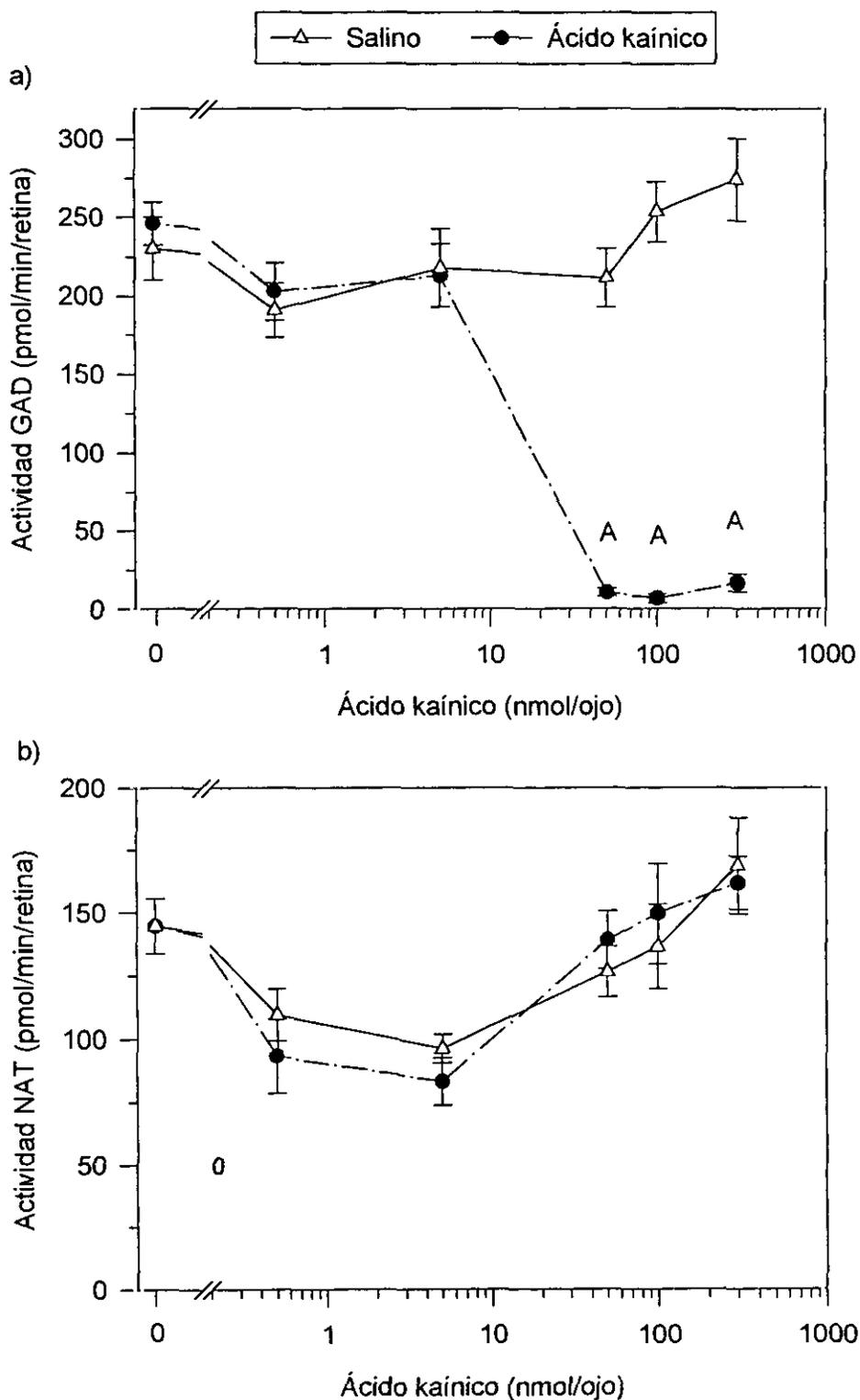
## **1. LESIONES OCULARES**

### **1.1. EFECTOS DE LA INYECCIÓN DE ÁCIDO KAÍNICO**

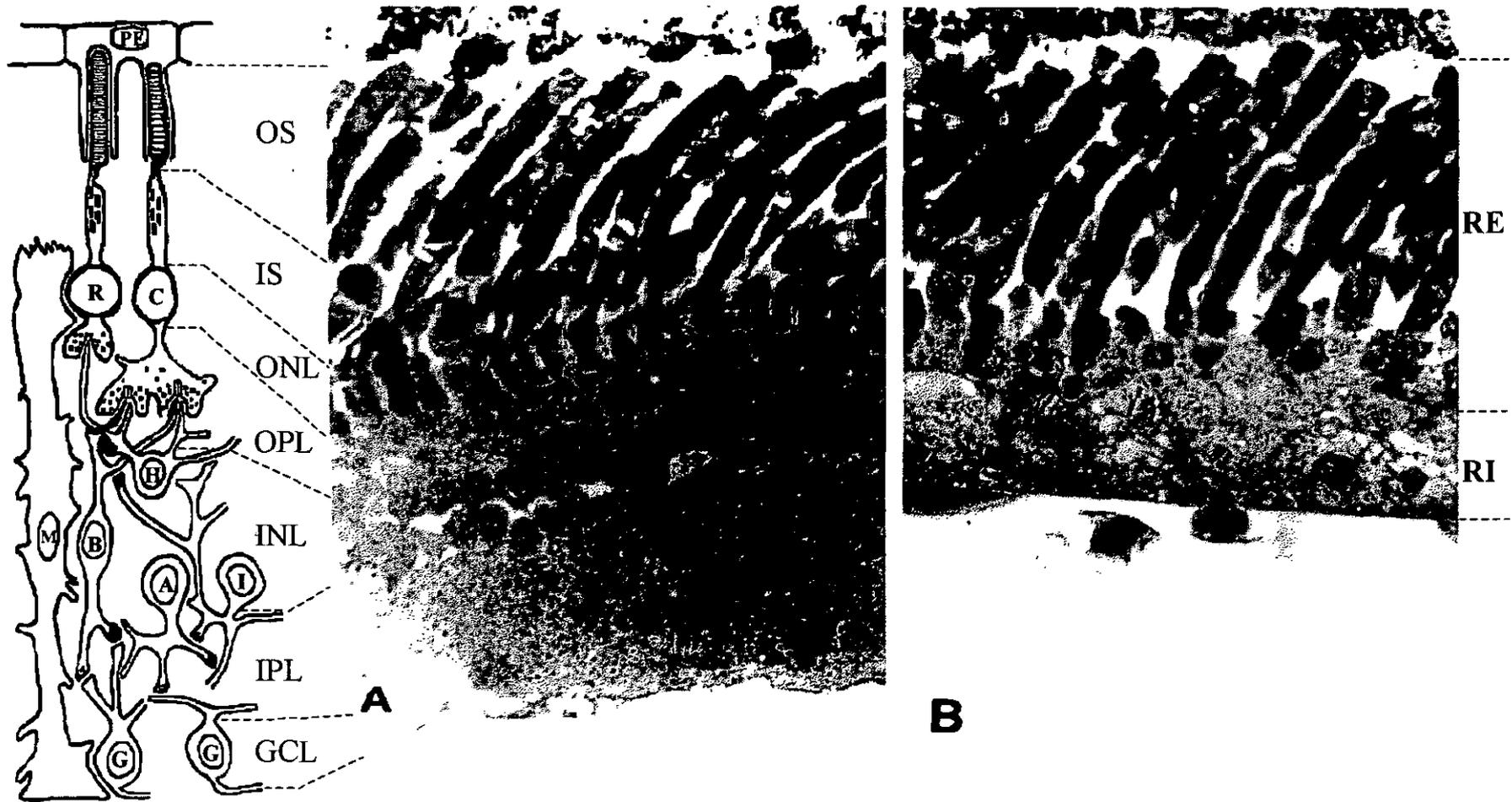
Para analizar los efectos del KA se utilizaron la actividad NAT como un marcador específico de los fotorreceptores y la actividad GAD como un marcador de las neuronas de la retina interna. En la figura 1 se representan los valores de las actividades NAT y GAD encontrados en las retinas una semana después de la inyección intraocular de distintas dosis de KA. La dosis de 50 nmol/ojo o dosis superiores provocaron una reducción drástica de la actividad GAD en los ojos inyectados con KA (Fig. 1a,  $p < 0,01$ ) mientras que en los ojos controles no se modificó, quedando únicamente un 3-6% de la actividad GAD después de la lesión. Por el contrario, no existieron diferencias en los valores de actividad NAT entre los ojos tratados con salino o KA a ninguna de las dosis utilizadas (Fig. 1b). Este resultado indica que los fotorreceptores no se ven afectados por el neurotóxico a dichas dosis.

La pérdida de actividad GAD en las retinas tratadas con KA sugiere una extensa muerte neuronal. Este hecho, es confirmado por los resultados obtenidos de la observación de preparaciones microscópicas de dichas retinas. En la figura 2 podemos ver que la inyección de KA produce una patente reducción del grosor de la retina, afectando principalmente a la retina interna. La capa nuclear interna resulta muy afectada, desapareciendo la mayoría de sus núcleos. Esta acusada muerte neuronal también se refleja en las capas plexiformes externa e interna que no sólo muestran una reducción en su grosor sino que también son mucho menos densas que en las retinas controles, llegándose incluso a apreciar espacios vacíos. Las células ganglionares también resultan afectadas por la acción del neurotóxico desapareciendo casi totalmente. Sin embargo, tanto las capas de los segmentos externos e internos como la capa nuclear externa permanecen inalteradas, indicando que los fotorreceptores no han sido dañados.

En la tabla I se muestran los resultados de la valoración morfométrica del grosor de la retina total, las células fotorreceptoras y la retina interna. Estos resultados confirman que la inyección intraocular de KA no causa ningún efecto sobre los fotorreceptores pero produce una marcada reducción del grosor de la retina interna.



**Figura 1:** Curva dosis-respuesta de la inyección intraocular de ácido kaínico sobre a) la actividad GAD y b) la actividad NAT de retinas de *Xenopus laevis*. Las retinas se extrajeron en la mitad de la fase oscura del fotociclo. Tras la homogenización, el homogeneizado se dividió en 2 alícuotas valorándose las actividades NAT y GAD. A, indica las significaciones estadísticas ( $p < 0,01$ ) respecto al ojo inyectado con salino.



**Figura 2:** Efecto de la inyección intraocular de ácido kaínico en la retina de *Xenopus laevis*. A. Retina control; B: Retina lesionada con 100 nmol de ácido kaínico. R: Bastón; C: Cono; M: Célula de Müller; B: Célula bipolar; H: Célula horizontal; A: Célula amacrina; I: Célula interplexiforme; C: Célula ganglionar; OS: Capa de los segmentos externos; IS: Capa de los segmentos internos; ONL: Capa nuclear externa; OPL: Capa interplexiforme externa; INL: Capa nuclear interna; IPL; Capa interplexiforme interna; GCL: Capa de las células ganglionares; RE: Retina externa; RI: Retina interna.

**Tabla 1:** Efecto de la inyección intraocular de 100 nmol de KA sobre el espesor de la retina total, las células fotorreceptoras y la retina interna de *Xenopus laevis* ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , unidades arbitrarias).

Tratamiento	Espesor total	Fotorreceptores	Retina interna
Salino	650,4 $\pm$ 13,2	325,4 $\pm$ 6,6	325,1 $\pm$ 7,4
Kainato	398,6 $\pm$ 13,6 *	295,8 $\pm$ 9,2	102,8 $\pm$ 7,5 *

\*  $p < 0,01$  vs el grupo inyectado con salino.

## 1.2. EFECTOS DE LISIS CON TRITON X-100

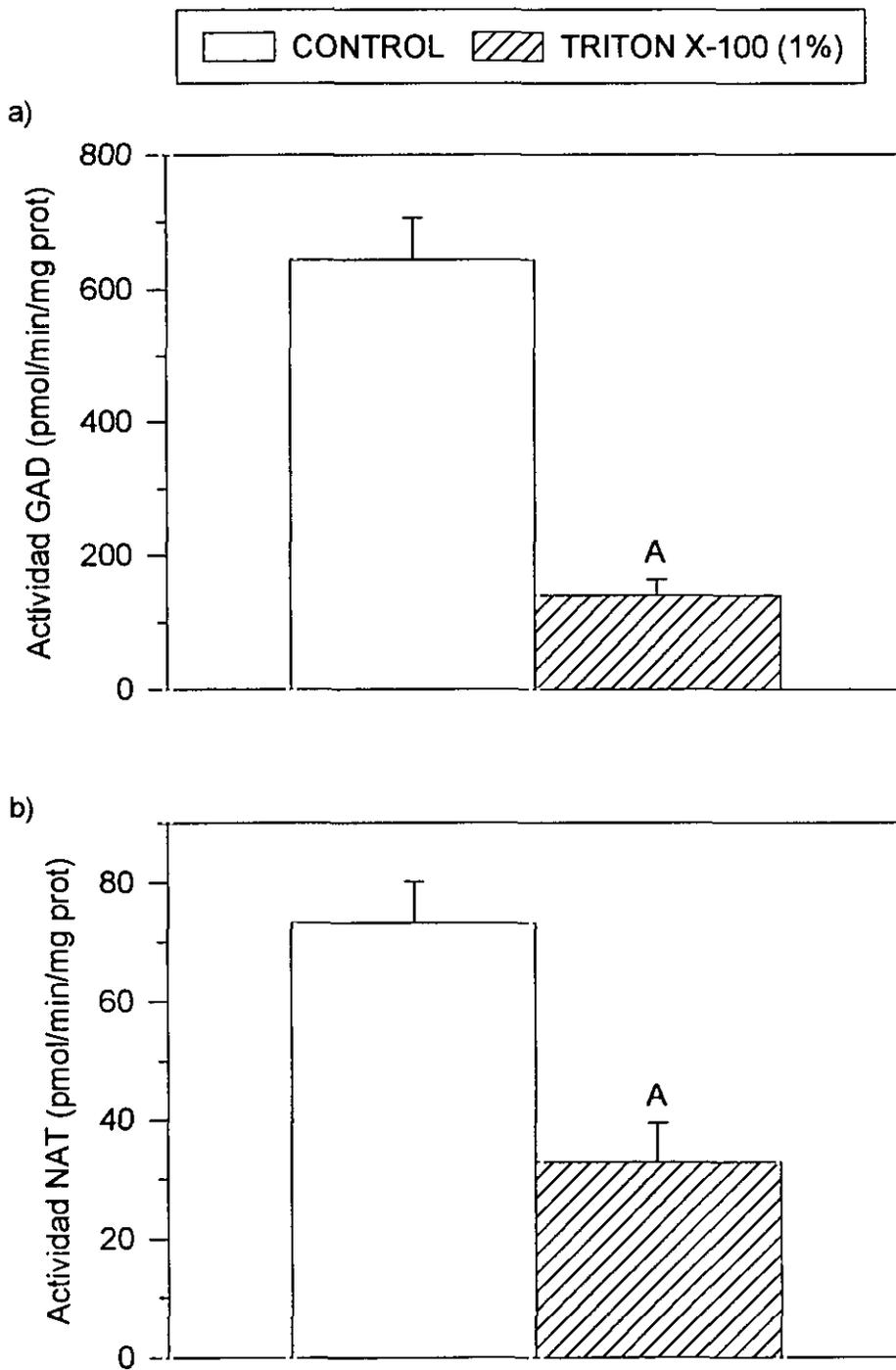
Otro de los métodos descritos en la bibliografía para obtener preparaciones de retinas enriquecidas en fotorreceptores es el tratamiento de copas ópticas con Triton X-100. En la figura 3 se muestran los efectos de la lisis con este detergente sobre la actividad NAT y GAD de la retina. Los datos se representan como la media  $\pm$  S.E.M. de los datos procedentes de 3 experimentos independientes ( $n_{\text{final}}=15$ ;  $n_{\text{experimento}}=5$ ). Las retinas lesionadas con Triton X-100 mostraron una gran reducción en sus niveles de actividad GAD (21% de la actividad del grupo control), indicando una extensa muerte neuronal en la retina interna. Los valores de la actividad NAT procedentes de retinas lesionadas con Triton X-100 también mostraron una reducción hasta el 45% de la actividad presente en las retinas controles, indicando que un elevado porcentaje de los fotorreceptores resultan dañados.

Por tanto, los resultados obtenidos en este apartado sugieren que las inyecciones intraoculares de KA en dosis de 50 nmol/ojo o superiores son un método más eficaz y seguro para obtener retinas enriquecidas en fotorreceptores.

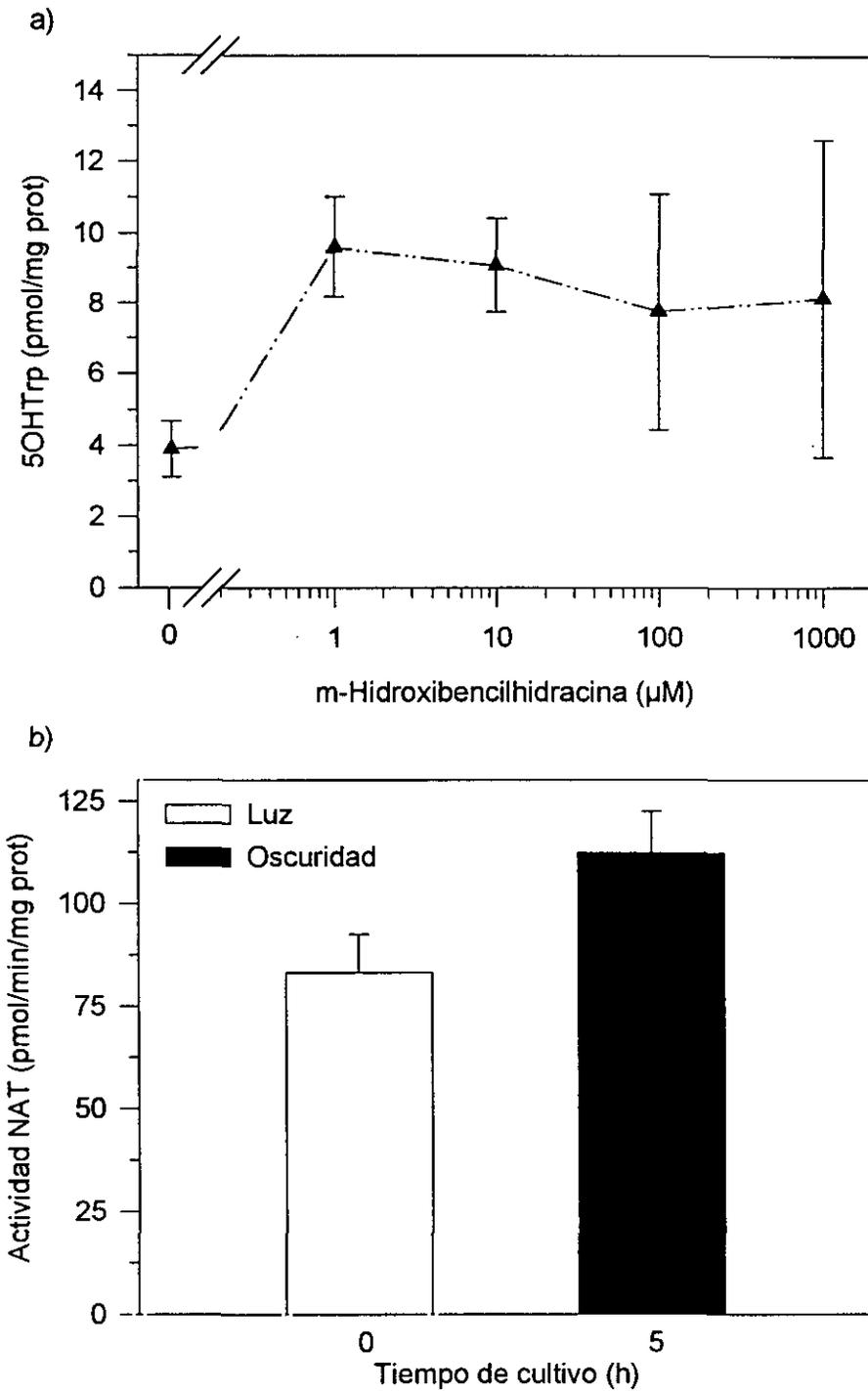
## 2. OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH *IN SITU*

### 2.1. ELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

En primer lugar, se buscó el medio de cultivo más adecuado para llevar a cabo la reacción. La utilización del medio MABA no parece ser adecuada ni para la determinación de la actividad TPH (Fig. 4a), ni de la actividad NAT (Fig. 4b). La adición de distintas concentraciones de mHBH no provocó la acumulación de 5OHTp esperada, obteniéndose además una gran dispersión de los datos. Así mismo, no se encontraron diferencias en los niveles de actividad NAT entre retinas extraídas en luz y retinas procedentes de copas ópticas cultivadas en oscuridad, indicando que los fotorreceptores cultivados en MABA carecen de la fotosensibilidad esperada.



**Figura 3:** Efecto de la lisis con Triton X-100 sobre a) la actividad GAD y b) la actividad NAT de la retina de *Xenopus laevis*. A, indica la significaciones estadísticas ( $p < 0,01$ ) respecto al grupo control.



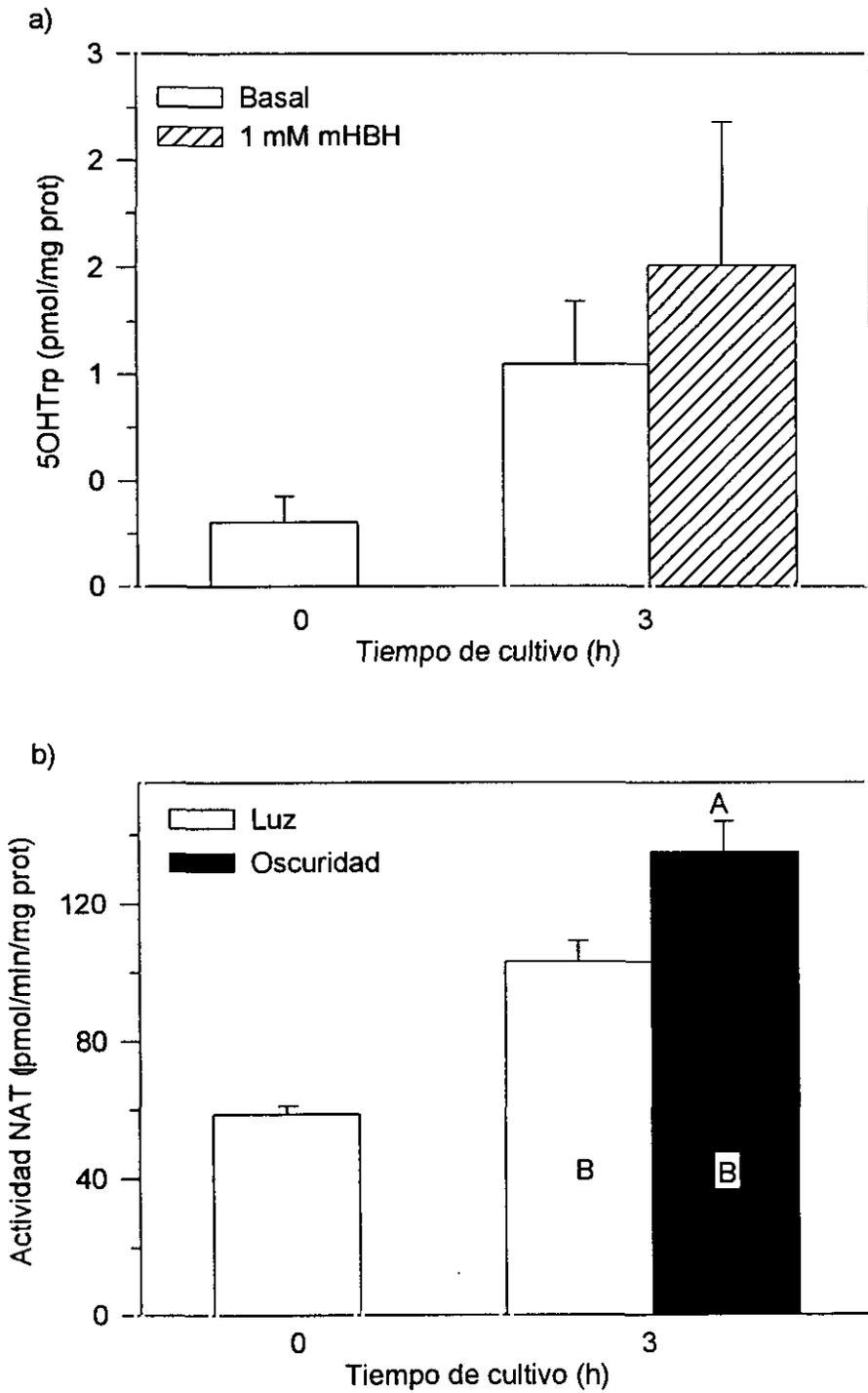
**Figura 4:** Cultivo de copas ópticas de *Xenopus laevis* en medio MABA durante 5 horas en oscuridad. a) Contenido de 5OHTrp en la retina después de 30 minutos de exposición a distintas concentraciones de mHBH. b) Actividad NAT en retinas extraídas en luz al final de la fase luminosa del fotociclo diario y retinas procedentes de copas ópticas cultivadas durante 5 horas en oscuridad.

Cuando el cultivo se realizó en medio MAWQ tampoco se encontró que la adición de 1 mM de mHBH produjese un aumento significativo de la acumulación de 5OHTrp respecto a los grupos basales (Fig. 5a), encontrándose de nuevo una gran dispersión de los datos en el grupo estimulado con mHBH. Además, los niveles basales aumentaron durante las 3 horas de cultivo. Sin embargo, en este medio los fotorreceptores muestran su fotosensibilidad característica aunque está es pequeña, encontrándose que los niveles de la actividad NAT retiniana de las copas ópticas cultivadas en oscuridad fueron significativamente mayores que los de las copas ópticas cultivadas en luz (Fig. 5b).

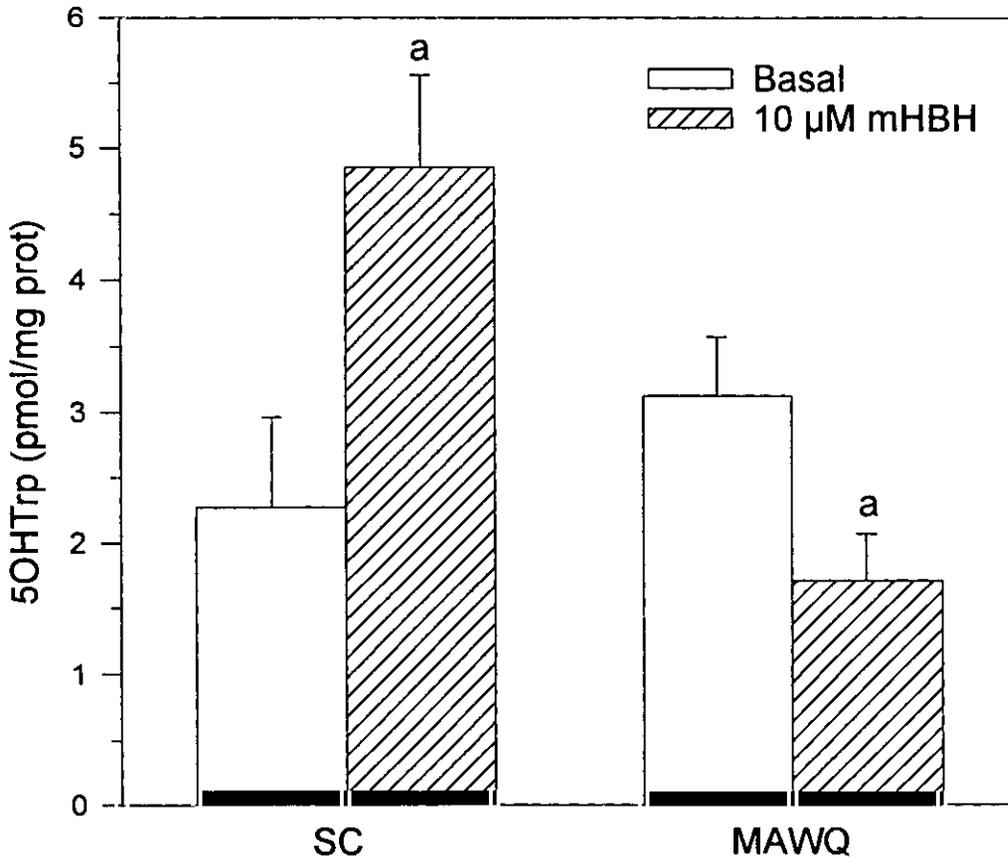
Cuando el cultivo se realizó en SC el contenido retiniano de 5OHTrp en las copas ópticas estimuladas con 10  $\mu$ M de mHBH fue el doble que en las controles (Fig. 6). Sin embargo, cuando se cultivó en medio MAWQ la adición de mHBH produjo una reducción del contenido de 5OHTrp. Por tanto, el medio SC parece adecuado para el cultivo de copas ópticas con el fin de determinar la actividad TPH presente en las mismas.

## **2.2. ÓPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA REACCIÓN PARA RETINAS INTACTAS**

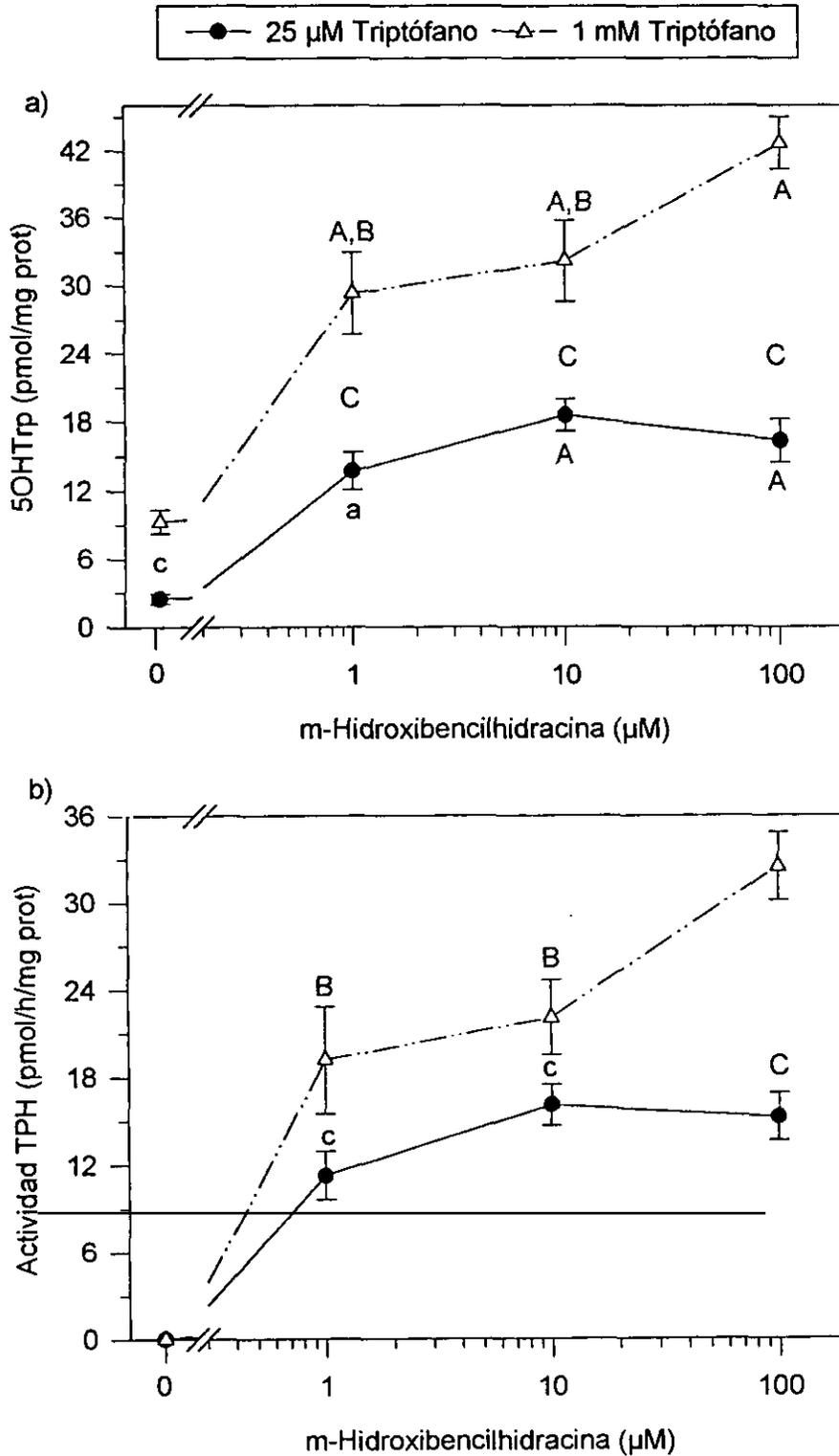
Una vez elegido el medio adecuado para llevar a cabo la reacción, se pasó a la optimización del resto de los parámetros de la misma para las retinas intactas. En primer lugar, se realizó una concentración-respuesta del inhibidor de la AAAD, el mHBH (Fig. 7). Tanto cuando el cultivo se realizó a 25  $\mu$ M de L-Trp como a 1 mM, la adición de mHBH induce un aumento en el contenido de 5OHTrp (Fig. 7a). De este modo, cuando el cultivo se realizó con 25  $\mu$ M de L-Trp todas las concentraciones utilizadas de mHBH producen la misma acumulación de 5OHTrp. Sin embargo, cuando las copas ópticas se cultivan con 1 mM de L-Trp la concentración de 100  $\mu$ M provocó una acumulación de este indol ligeramente mayor que cualquiera de las otras concentraciones. Los valores absolutos de 5OHTrp siempre fueron mayores cuando el cultivo se realizó con 1 mM de L-Trp que con 25  $\mu$ M, incluso cuando no hay mHBH en el medio. Este aumento en los niveles basales supuso que los valores de la actividad enzimática a ambas concentraciones se diferenciaron menos de lo esperado (Fig. 7b). Por tanto, la dosis escogida de mHBH para la determinación de la actividad TPH en las retinas intactas en el resto de experimentos de esta memoria fue 10  $\mu$ M.



**Figura 5:** Cultivo de copas ópticas de *Xenopus laevis* en medio MAWQ durante 3 horas en oscuridad. a) Contenido de 5OHTrp retiniano de copas ópticas de *Xenopus laevis* incubadas durante 30 minutos en presencia o ausencia de 1 mM de mHBH. b) Actividad NAT de retinas procedentes de copas ópticas cultivadas durante 3 horas en luz o oscuridad. Las letras mayúsculas indican las significaciones estadísticas  $p < 0,01$ . A, vs luz; B, vs las retinas no cultivadas.



**Figura 6:** Contenido retiniano de 5OHTrp, basal o estimulado con 10  $\mu$ M mHBH, en copas ópticas de *Xenopus laevis* cultivadas en SC o en medio MAWQ durante 3 horas en oscuridad. Tiempo de reacción fue 1 hora. a, indica las significaciones estadísticas  $p < 0,05$  respecto a los grupos basales.

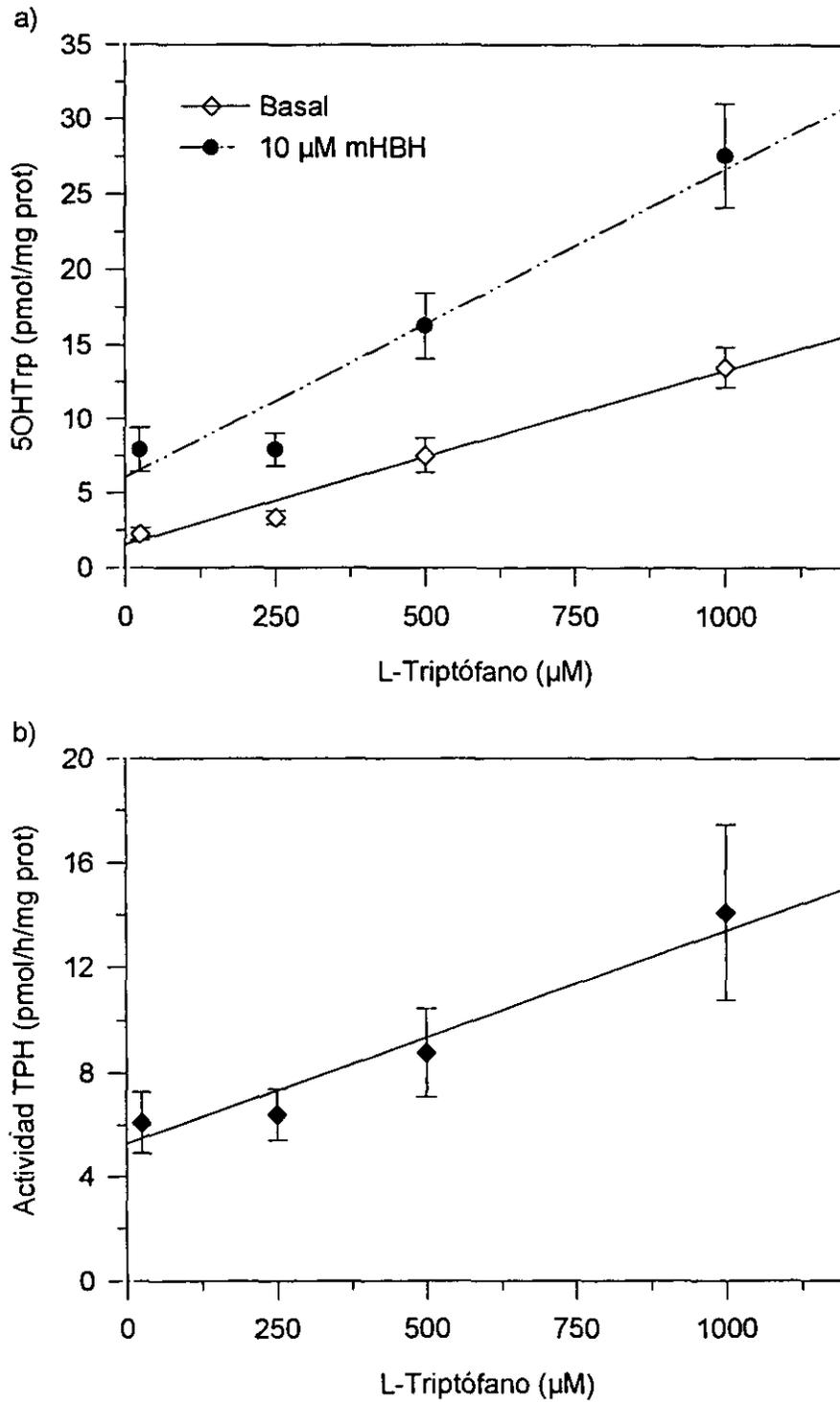


**Figura 7:** Curva concentración-respuesta de mHBH sobre a) el contenido retiniano de 5OHTrp y b) la actividad TPH de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH las copas ópticas fueron cultivadas en SC con 2 concentraciones distintas de L-Trp (25 µM y 1 mM) durante 3 horas en oscuridad. Tiempo de reacción fue 1 hora. Las letras indican las significaciones estadísticas: minúsculas  $p < 0,05$ , mayúsculas  $p < 0,01$ . A, vs el grupo cultivado en ausencia de mHBH; B, vs el grupo tratado con 100 µM de mHBH; c, vs los grupos cultivados con 1 mM de L-Trp.

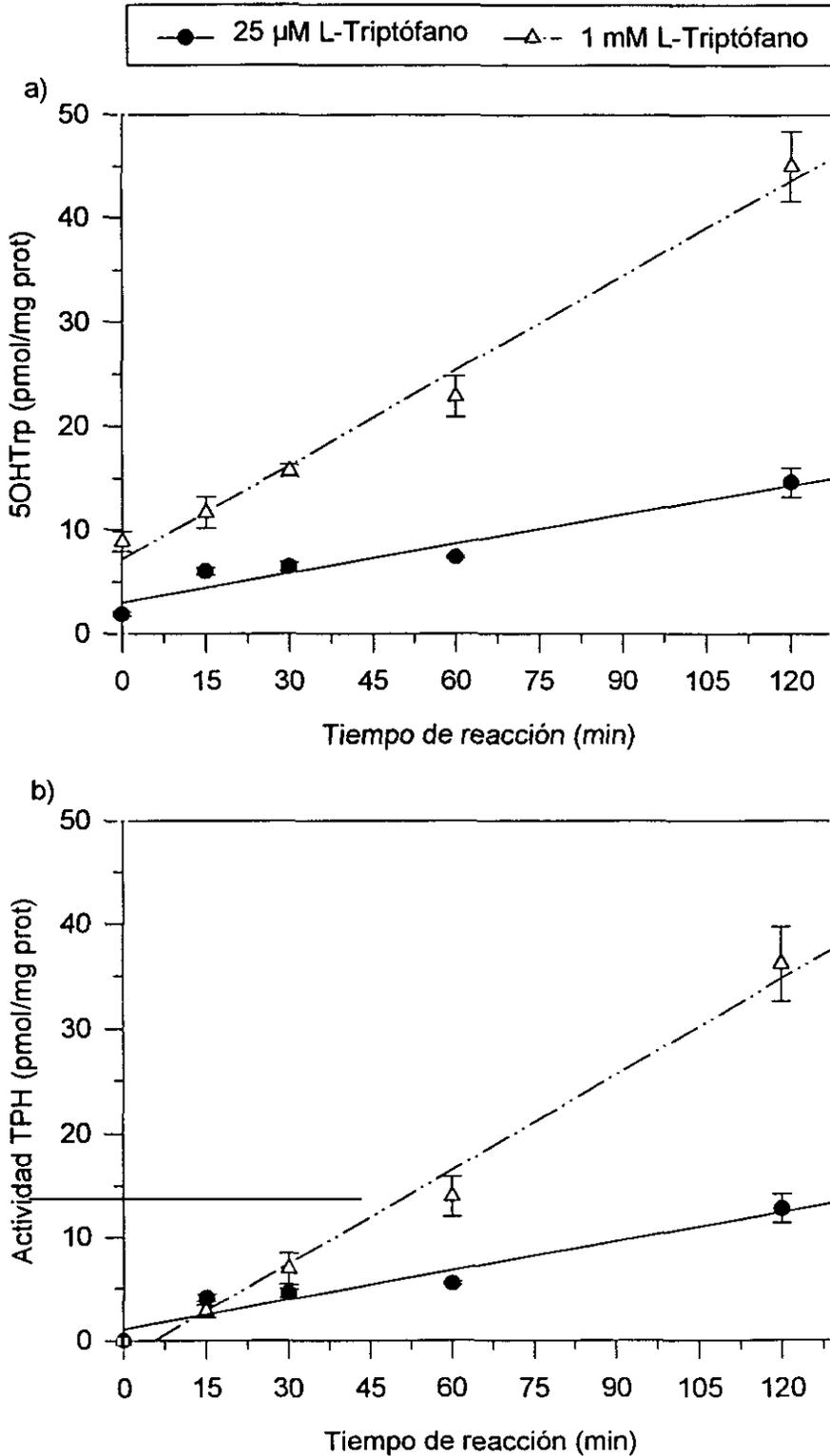
Los resultados anteriores sugieren que la concentración de L-Trp en el medio es determinante para el valor de la actividad TPH *in situ*, por lo cual se realizó el estudio de la concentración-respuesta de este aminoácido. En la figura 8a observamos como un incremento de la concentración del sustrato de la reacción, L-Trp, en la SC provoca un aumento lineal del contenido de 5OHTrp tanto en condiciones basales ( $r=0,67$ ) como estimuladas con mHBH ( $r=0,553$ ). Además, la diferencia en las pendientes de ambas rectas (Basal  $b=0,012$ ; Estimuladas  $b=0,021$ ) nos está sugiriendo que la actividad TPH depende del contenido de L-Trp en la SC como se puede comprobar en la figura 8b. De este modo, 1 mM parece una concentración de L-Trp adecuada para la valoración de la actividad TPH siempre y cuando la reacción sea lineal durante el tiempo de reacción.

Por tanto, se estudió el desarrollo de la reacción respecto al tiempo, encontrándose que tanto la acumulación de 5OHTrp (Fig. 9a) como la actividad TPH (Fig. 9b) fueron lineales durante todo el periodo de tiempo estudiado (120 minutos). La linealidad se conservó cuando el cultivo se realizó con 25  $\mu\text{M}$  ( $r=0,965$ ) y 1 mM de L-Trp ( $r=0,993$ ). Por tanto, para el resto de los experimentos de esta memoria realizados con retinas intactas el tiempo de reacción fue de 1 hora y la concentración de L-Trp en la SC de 1 mM.

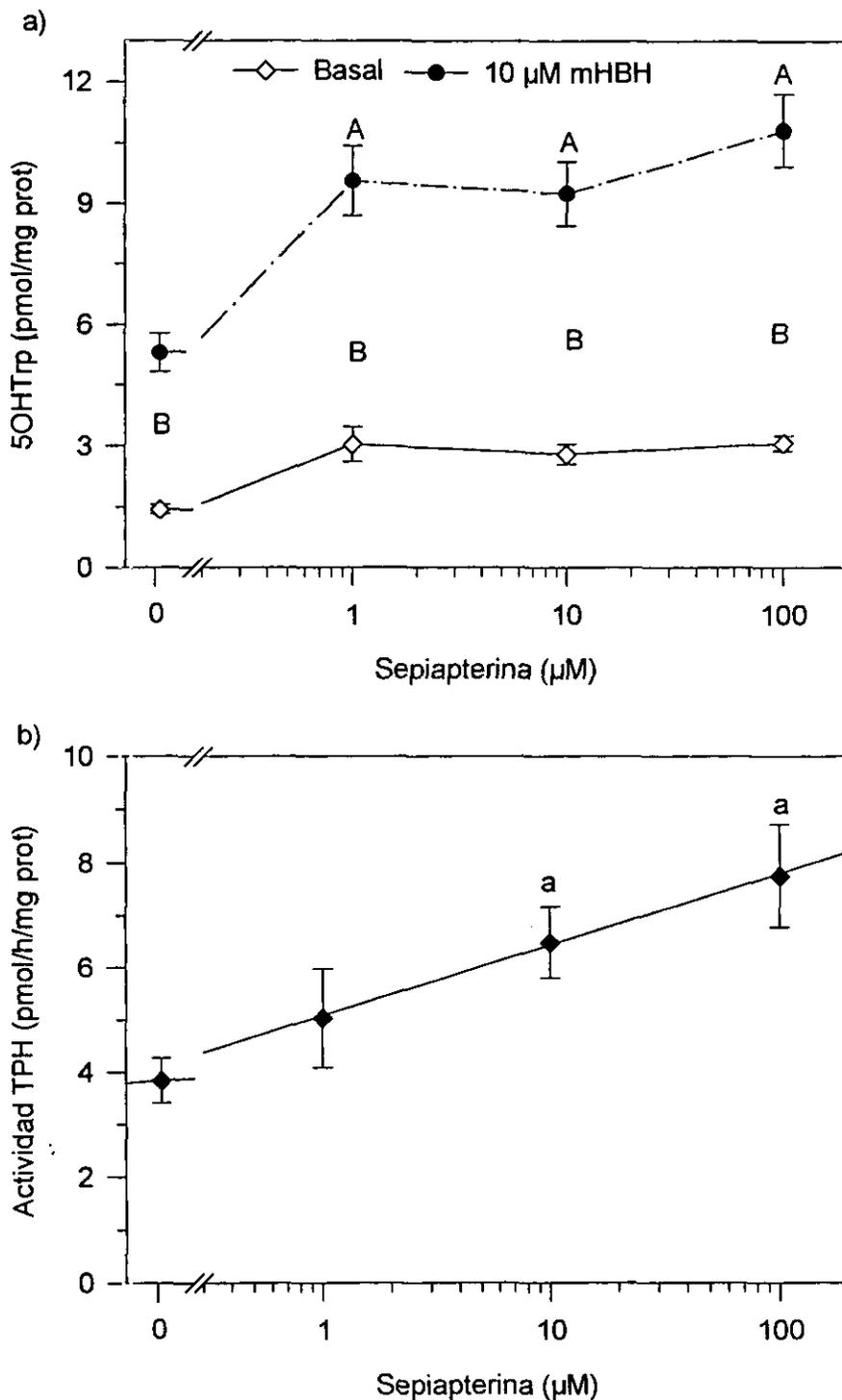
La fuerte dependencia de la actividad TPH respecto al sustrato de la reacción hace plantearse si la concentración del cofactor, tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), puede ser limitante también para la determinación de la actividad enzimática. Sin embargo, se ha descrito que la adición de tetrahidrobiopterina en cultivo tiene efectos tóxicos y provoca muerte celular, por lo que para la realización de este experimento utilizamos un precursor de su síntesis, la sepiapterina, que carece de dichos efectos secundarios. Este compuesto es captado por las células y transformado en  $\text{BH}_4$  por la acción de la sepiapterina reductasa. La adición de varias concentraciones de sepiapterina en la SC provocó un aumento del contenido de 5OHTrp respecto al control en las retinas estimuladas con mHBH pero no en las basales (Fig. 10a), induciendo un incremento de la actividad enzimática homogéneo para todas las concentraciones de sepiapterina probadas (Fig. 10b).



**Figura 8:** Curva concentración-respuesta de L-Trp sobre a) el contenido de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas de *Xenopus laevis* procedentes de copas ópticas intactas cultivadas durante 3 horas en oscuridad. Tiempo de reacción 1 hora; concentración de mHBH (10 µM).



**Figura 9:** Desarrollo temporal de a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH tras la adición de 10  $\mu\text{M}$  de mHBH en retinas intactas de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH las copas ópticas fueron cultivadas en SC a 2 concentraciones distintas de L-Trp (25  $\mu\text{M}$  y 1 mM) durante 3 horas en oscuridad.



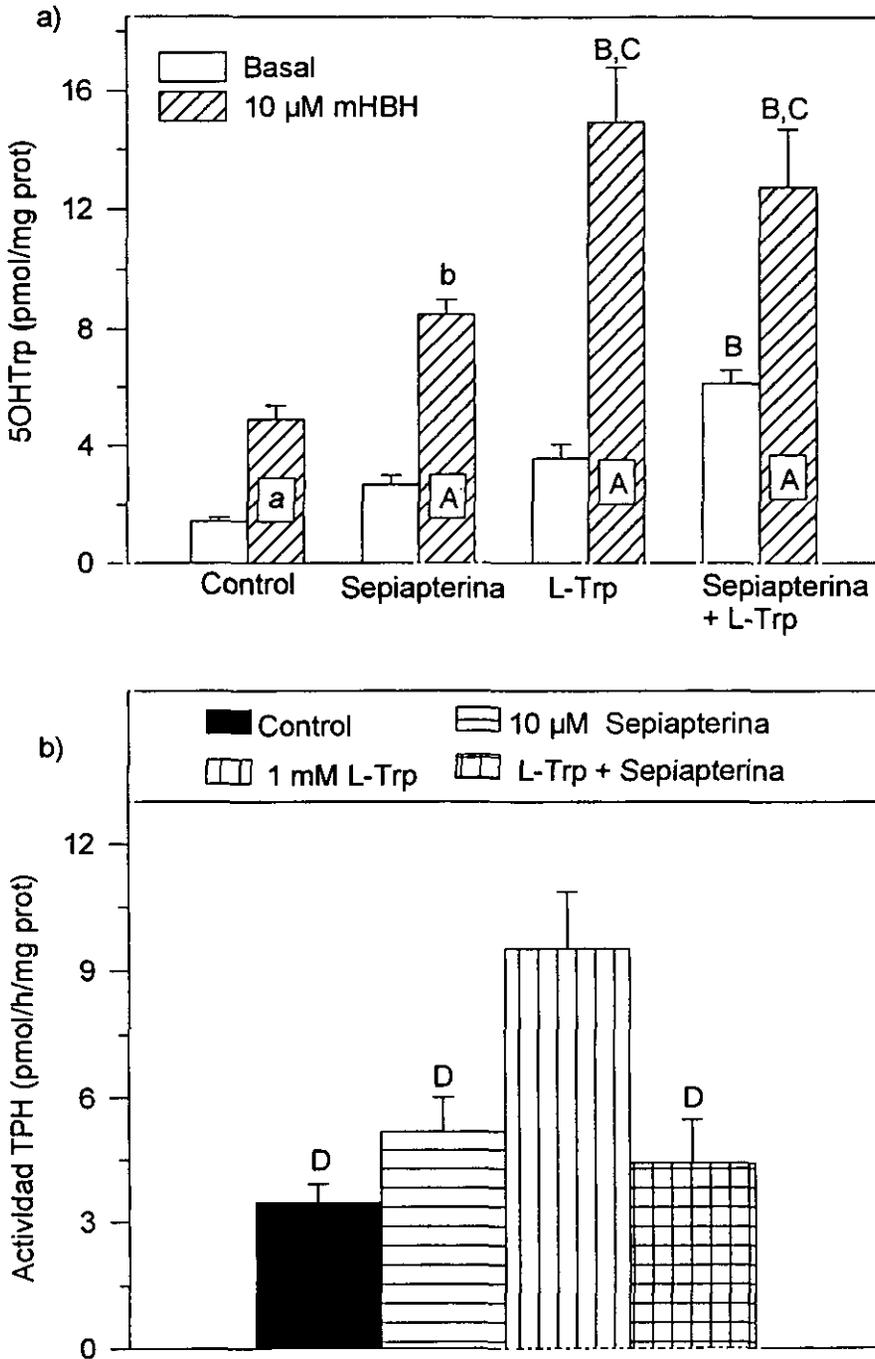
**Figura 10:** Efecto de la concentración de la sepiapterina sobre a) el contenido de 5OHTp y b) la actividad TPH en retinas de *Xenopus laevis* procedentes de copas ópticas intactas cultivadas durante 3 horas en oscuridad. Tiempo de reacción fue 1 hora; concentración de mHBH fue 10 µM. Las letras mayúsculas indican las significaciones estadísticas ( $p < 0,01$ ). A, vs el grupo cultivado en ausencia de sepiapterina. B, vs el grupo basal.

En la figura 11 se muestra el efecto de la adición de 10  $\mu\text{M}$  de sepiapterina y 1 mM de L-Trp por separado o conjuntamente sobre el contenido retiniano de 5OHTrp y la actividad TPH. La adición conjunta de sepiapterina y L-Trp provocó una sobreestimulación en el contenido basal de 5OHTrp respecto a la adición por separado de cada uno de ellos (Fig. 11a). Este efecto no se detectó en los grupos estimulados con mHBH, encontrándose que el grupo tratado con L-Trp tenía el mismo contenido de 5OHTrp que el tratado con sepiapterina y L-Trp. Por tanto, cuando los resultados se expresaron como actividad TPH, el grupo tratado con sepiapterina y L-Trp mostró una actividad enzimática menor que el tratado únicamente con L-Trp.

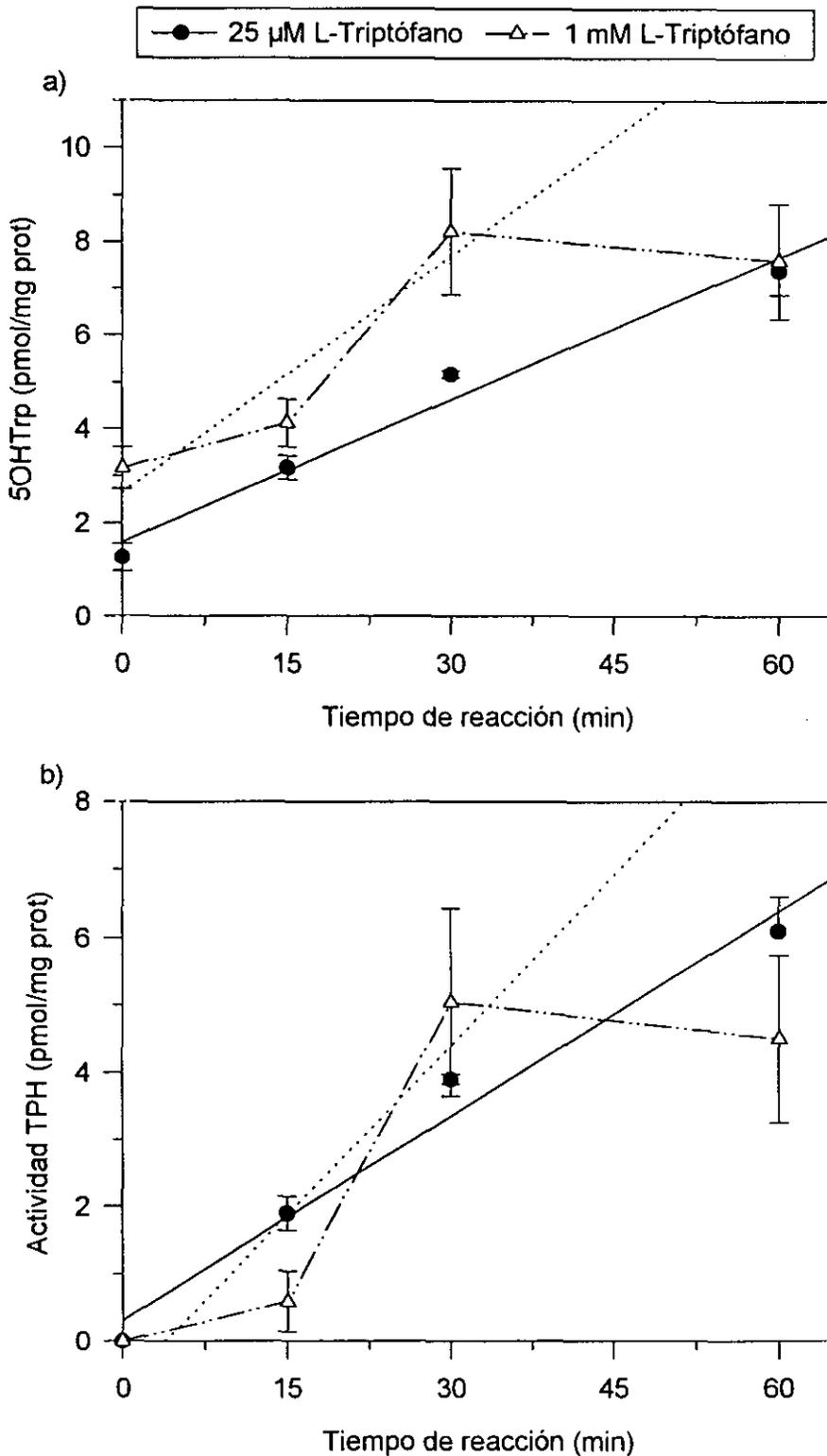
### **2.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA REACCIÓN PARA RETINAS LESIONADAS CON KA.**

En primer lugar, se estudió el desarrollo temporal de la reacción utilizando dos concentraciones de L-Trp (Fig. 12). De este modo, cuando el cultivo se realizó con una concentración de 25  $\mu\text{M}$  de L-Trp, la reacción fue lineal ( $r=0,976$ ) durante todo el tiempo estudiado (60 minutos). Sin embargo, si el cultivo tiene lugar con 1 mM L-Trp la linealidad se conserva únicamente durante los primeros 30 minutos. Es importante señalar, que al igual que ocurría para las retinas intactas, la adición de 1 mM de L-Trp durante el tiempo de cultivo, eleva los niveles basales de 5OHTrp, disminuyendo por tanto la diferencia entre niveles basales y estimulados y dando lugar a una reducción de la actividad enzimática. Por tanto, para las copas ópticas lesionadas, la concentración de L-Trp durante el tiempo de cultivo previo a la reacción siempre será de 25  $\mu\text{M}$  para mantener bajos los niveles basales de 5OHTrp. Así mismo, el tiempo de reacción para el resto de los experimentos de esta memoria se fijará en 30 minutos.

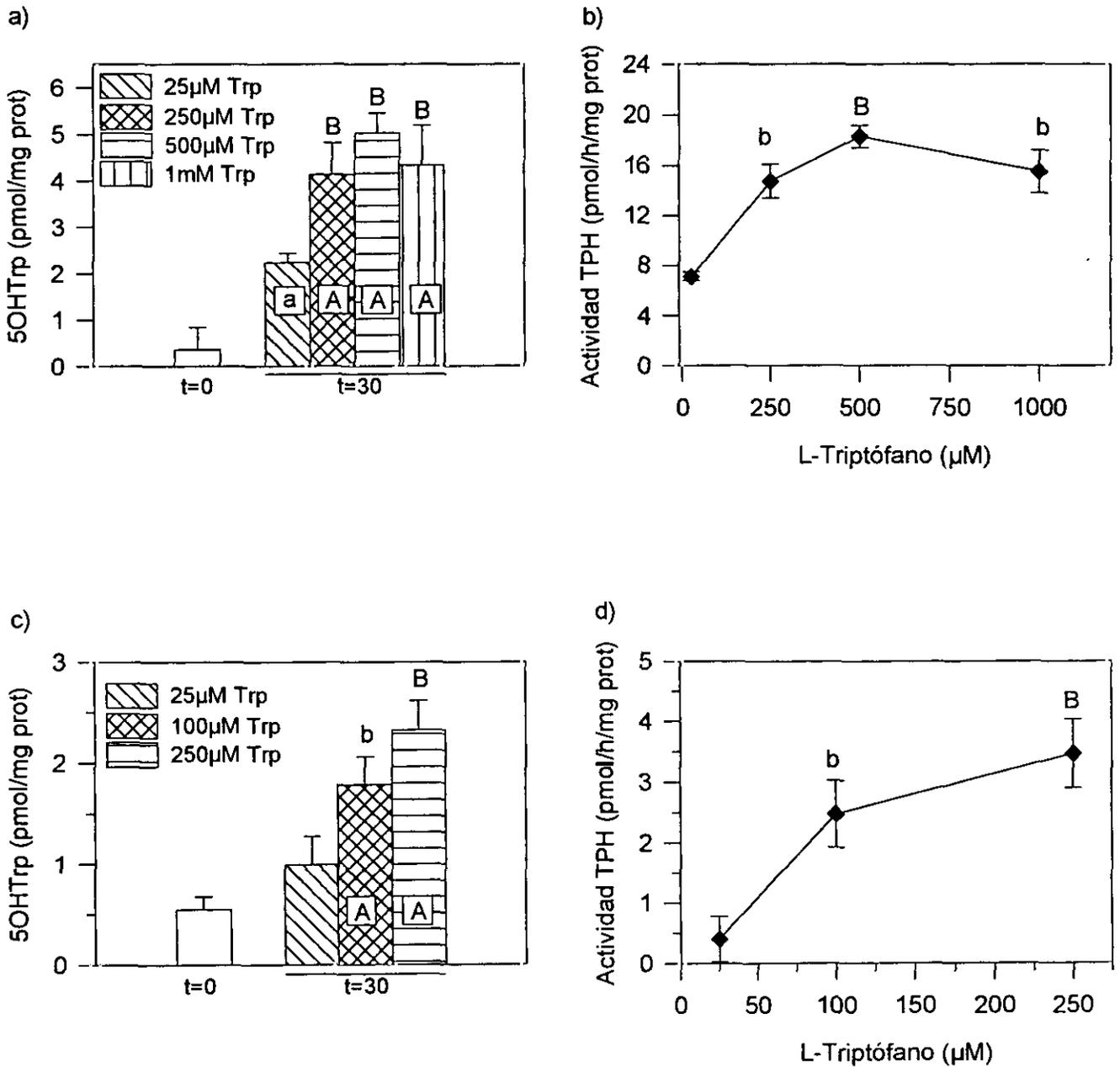
En la figura 13 se observa el efecto de la adición de varias concentraciones de L-Trp durante la reacción. Concentraciones de L-Trp superiores a 250  $\mu\text{M}$  provocaron una estimulación tanto de la acumulación de 5OHTrp (Fig. 13a) como de la actividad enzimática (Fig. 13b) respecto a la concentración basal de 25  $\mu\text{M}$ , no existiendo diferencias significativas entre las concentraciones superiores a 250  $\mu\text{M}$  de L-Trp. Es más, en un experimento posterior, se comprobó que esta estimulación máxima se alcanza a concentraciones de L-Trp tan bajas como 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 13c y d).



**Figura 11:** Efecto de la sepiapterina (10 μM) y del L-Trp (1 mM) en las retinas procedentes de copas ópticas intactas de *Xenopus laevis* cultivadas durante 3 horas en oscuridad. El tiempo de reacción fue 1 hora; concentración de mHBH (10 μM). Las letras indican las significaciones estadísticas: mayúsculas p<0,01, minúsculas p<0,05. a, vs el grupo basal; b, vs el grupo control; C, vs al grupo tratado con sepiapterina; D, vs el grupo tratado con L-Trp.



**Figura 12:** Desarrollo temporal de a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH tras la adición de mHBH (10  $\mu$ M) en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH las copas ópticas fueron cultivadas en SC a 2 concentraciones distintas de L-Trp (25  $\mu$ M y 1 mM) durante 3 horas en oscuridad. La línea punteada muestra la recta de regresión a la que se ajusta el contenido de 5OHTrp y la actividad TPH durante los primeros 30 min. de reacción en el grupo cultivado con 1 mM de L-Trp.



**Figura 13:** Efecto de la concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición de 10 μM de mHBH las copas ópticas fueron cultivadas en SC con 25 μM de L-Trp durante 3 horas en oscuridad. Tiempo de reacción 30 minutos. Las letras indican las significaciones estadísticas: minúsculas  $p < 0,05$ , mayúsculas  $p < 0,01$ . A, vs el grupo blanco. B, vs 25 μM de L-Trp.

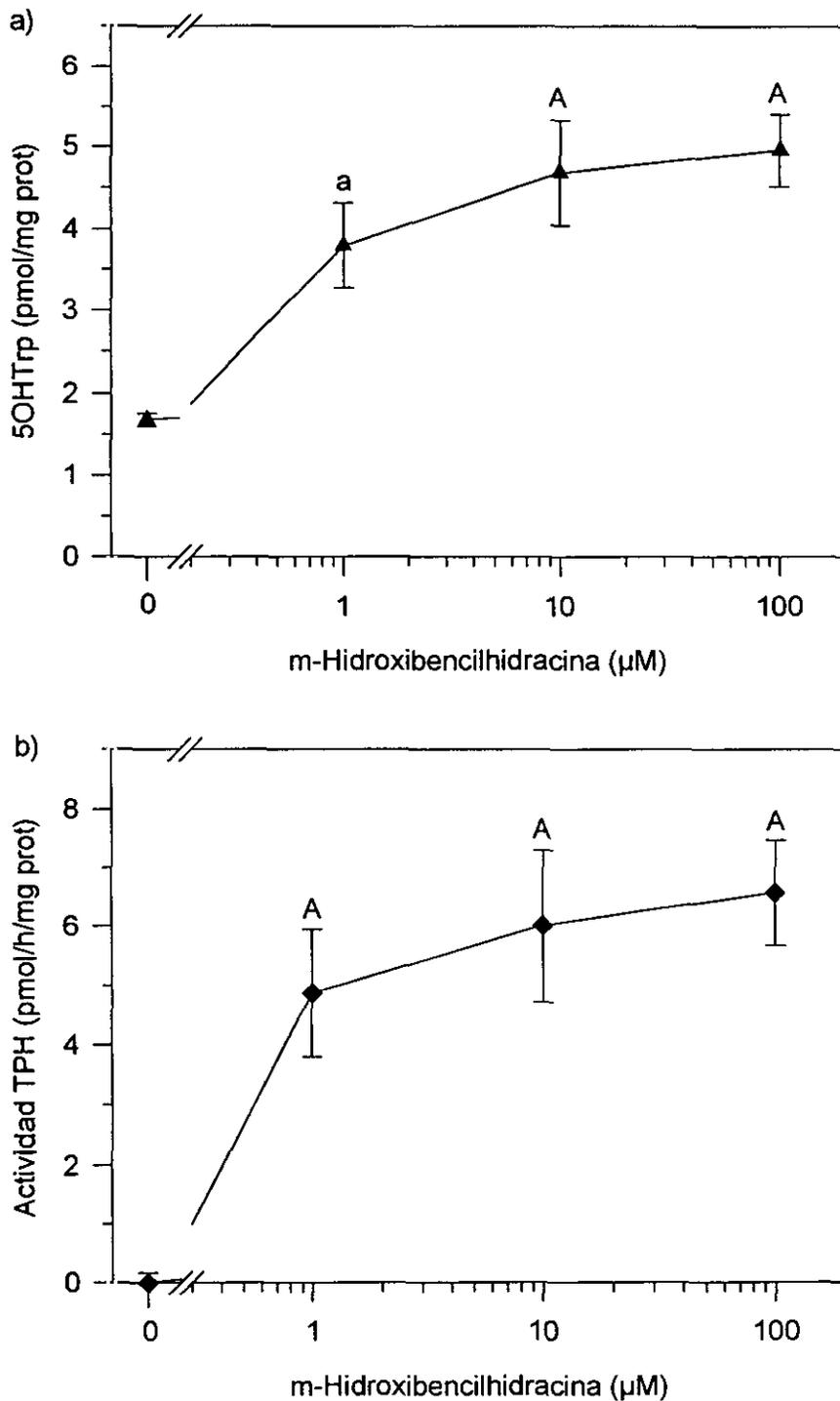
Una vez establecido el tiempo de reacción y la concentración óptima de L-Trp en la SC durante el tiempo de reacción, se realizó una curva concentración-respuesta de mHBH para determinar la concentración óptima de mHBH para la determinación de la actividad enzimática en las retinas lesionadas (Fig. 14). Concentraciones tan bajas como 1  $\mu\text{M}$  provocaron un aumento significativo de la acumulación de 5OHTrp (Fig. 14a) y de la actividad TPH (Fig. 14b). Concentraciones mayores no provocaron aumentos superiores de ninguno de estos dos parámetros.

En la Fig. 15 se representa la curva concentración-respuesta de sepiapterina. Al contrario de lo encontrado para las retinas intactas, en las retinas lesionadas con KA ninguna de las concentraciones de sepiapterina probadas produjo una estimulación ni de la acumulación del 5OHTrp (Fig. 15a) ni de la actividad enzimática (Fig. 15b).

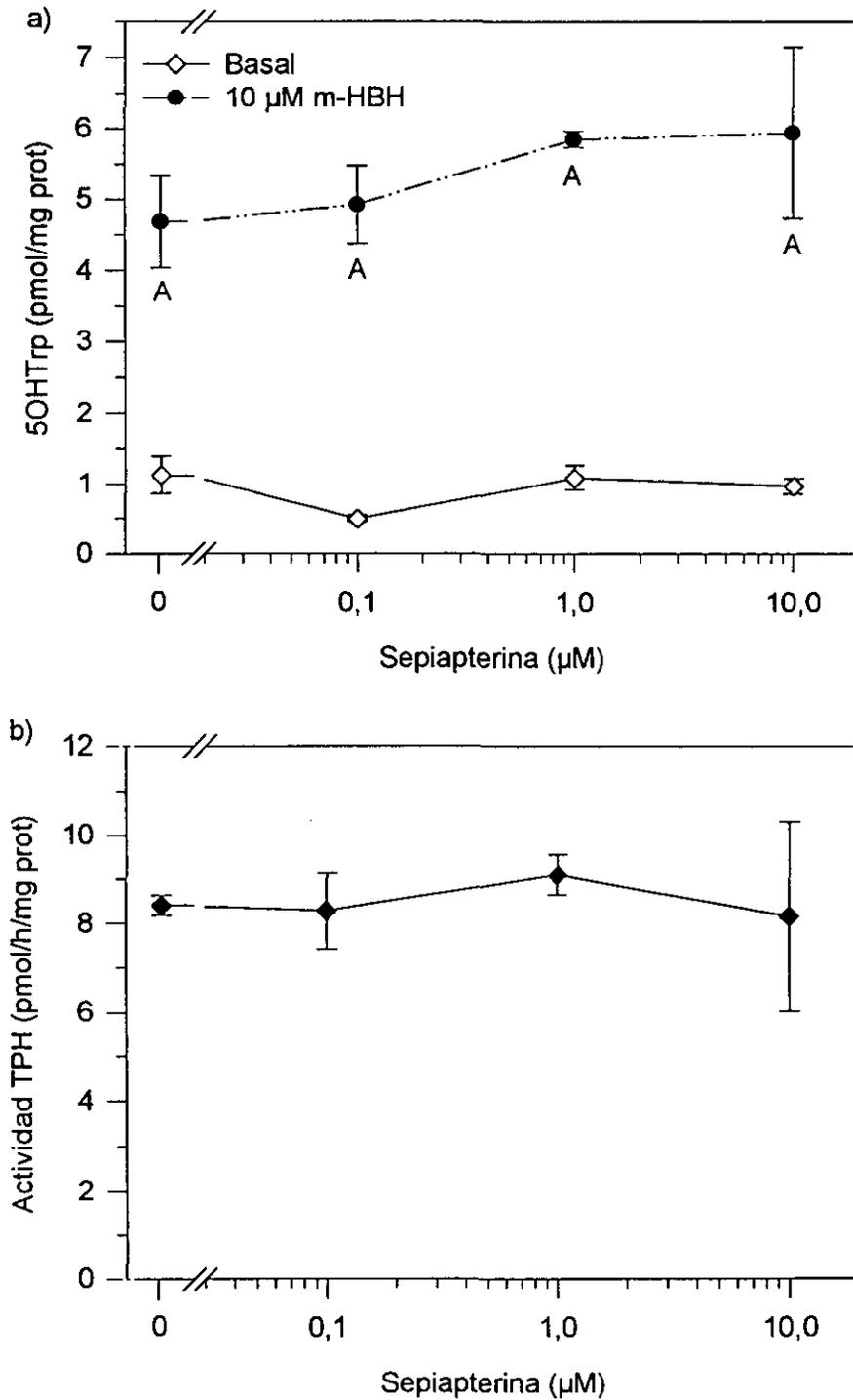
Finalmente, se comprobó la viabilidad del cultivo de copas ópticas lesionadas con KA durante varias horas. En la figura 16 se demuestra que tanto el medio de cultivo como las condiciones de cultivo que hemos fijado permiten prolongar el cultivo de copas ópticas al menos 6 horas. Durante este periodo de tiempo, la acumulación de 5OHTrp (Fig. 16a) y la actividad TPH (Fig. 16b) se mantuvieron constantes, no existiendo diferencias entre los distintos tiempos de cultivo utilizados. Únicamente, cabe señalar que el primer punto mostró unos valores ligeramente superiores, posiblemente porque el tejido no ha tenido tiempo suficiente para estabilizarse en el medio nuevo.

#### **2.4. COMPROBACIÓN DE LA LESIÓN OCULAR: CONTENIDO DE DOPAMINA Y SEROTONINA OCULAR.**

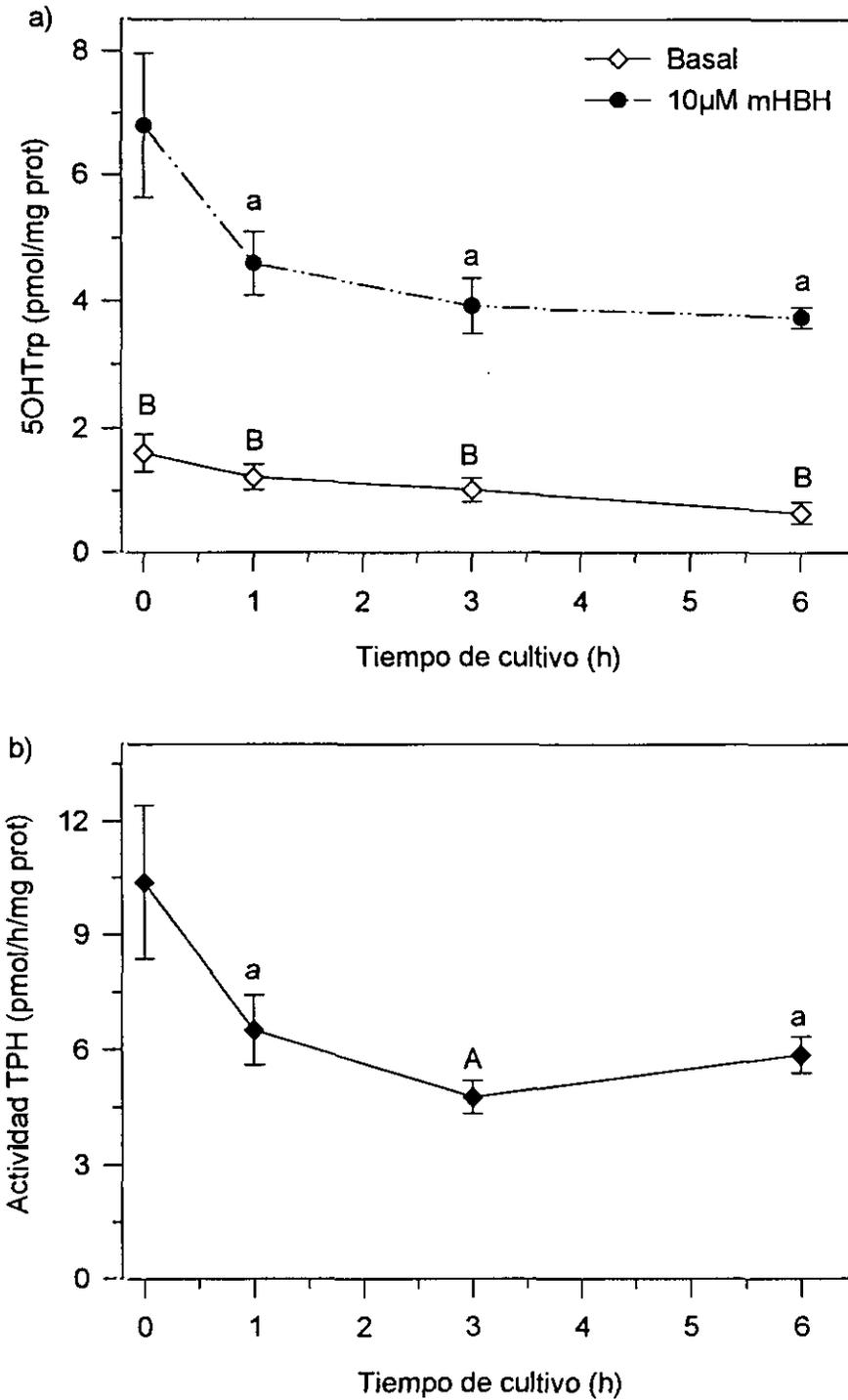
En el apartado 1.1 de los resultados habíamos visto que la actividad GAD es un buen marcador de la lesión ocular. Sin embargo, el procesamiento de las muestras necesario para la determinación de la actividad GAD es incompatible con la determinación de la actividad TPH *in situ*. Por tanto, para los próximos experimentos de esta memoria, necesitamos otros marcadores compatibles con el sistema de cultivo de copas ópticas. El principal objetivo de las lesiones oculares es provocar la muerte neuronal selectiva de las neuronas retinianas, principalmente las serotoninérgicas. Por tanto, el contenido de dopamina y serotonina de las retinas podrían ser unos



**Figura 14:** Curva concentración-respuesta de mHBH sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH las copas ópticas fueron cultivadas en SC con 25  $\mu\text{M}$  de L-Trp durante 3 horas en oscuridad. El tiempo de reacción fue 30 minutos y concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción 250  $\mu\text{M}$ . Las letras indican las significaciones estadísticas: minúsculas  $p < 0,05$ , mayúsculas  $p < 0,01$ . A, vs el grupo blanco



**Figura 15:** Efecto de la concentración de la sepiapterina sobre a) el contenido de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición de 10 µM de mHBH las copas ópticas fueron cultivadas en SC con 25 µM de L-Trp durante 3 horas en oscuridad. El tiempo de reacción fue 30 min; la concentración de L-Trp 250 µM. A,  $p < 0,01$  vs los grupos tratados con 10 µM de mHBH.

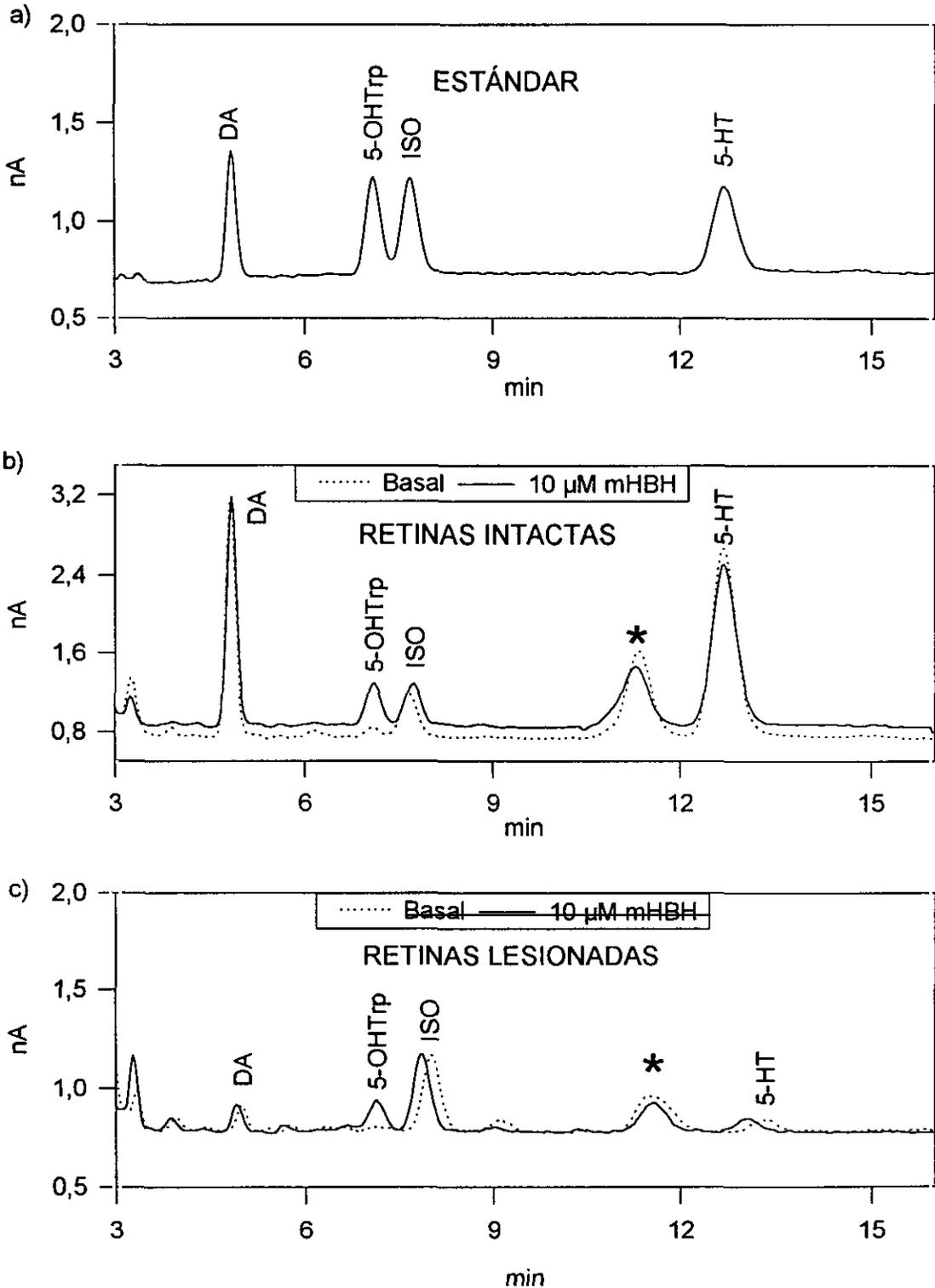


**Figura 16:** Efecto del tiempo de cultivo sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición de 10 µM de mHBH las copas ópticas fueron cultivadas en oscuridad en SC con 25 µM de L-Trp durante el tiempo indicado en el eje de abscisas. Tiempo de reacción fue 30 min; concentración de L-Trp 250 µM. Las letras muestran las significaciones estadísticas: minúsculas p<0,05, mayúsculas p<0,01. a, vs tiempo 0; b, vs los grupos tratados con 10 µM de mHBH.

buenos marcadores de la extensión de la lesión. Además, ambos neuromoduladores pueden determinarse utilizando las mismas condiciones cromatográficas usadas para la determinación del 5OHTrp. En el esquema 9 se muestra un cromatograma tipo de los estándares, de una retina intacta y de una retina lesionada con KA. Todos los compuestos de la muestra, así como el estándar interno (isoproterenol) muestran una buena resolución. Se puede apreciar que el pico de dopamina y el de serotonina sufren una marcada reducción en las retinas lesionadas con KA respecto a las retinas controles. También se observa que el pico del 5OHTrp es pequeño en las retinas basales y aumenta notablemente tras el tratamiento con mHBH (10  $\mu$ M), permitiendo por tanto, la determinación de la actividad TPH.

En la tabla 2 se muestra el contenido de serotonina y dopamina ocular en retinas intactas y lesionadas con KA en 5 experimentos de esta memoria. Ambos parámetros pueden ser utilizados como marcadores de la lesión. Por un lado, no se ven afectados por el cultivo mostrando en los 5 experimentos unos valores homogéneos del contenido de ambos neuromoduladores entre todos los grupos de retinas intactas o lesionadas de un mismo experimento. Por otro, en todos los casos las retinas lesionadas con KA presentaron una marcada reducción del contenido de ambos neuromoduladores. De este modo el contenido medio de dopamina se redujo al 28.89% del de los grupos controles y la serotonina al 11.39%.

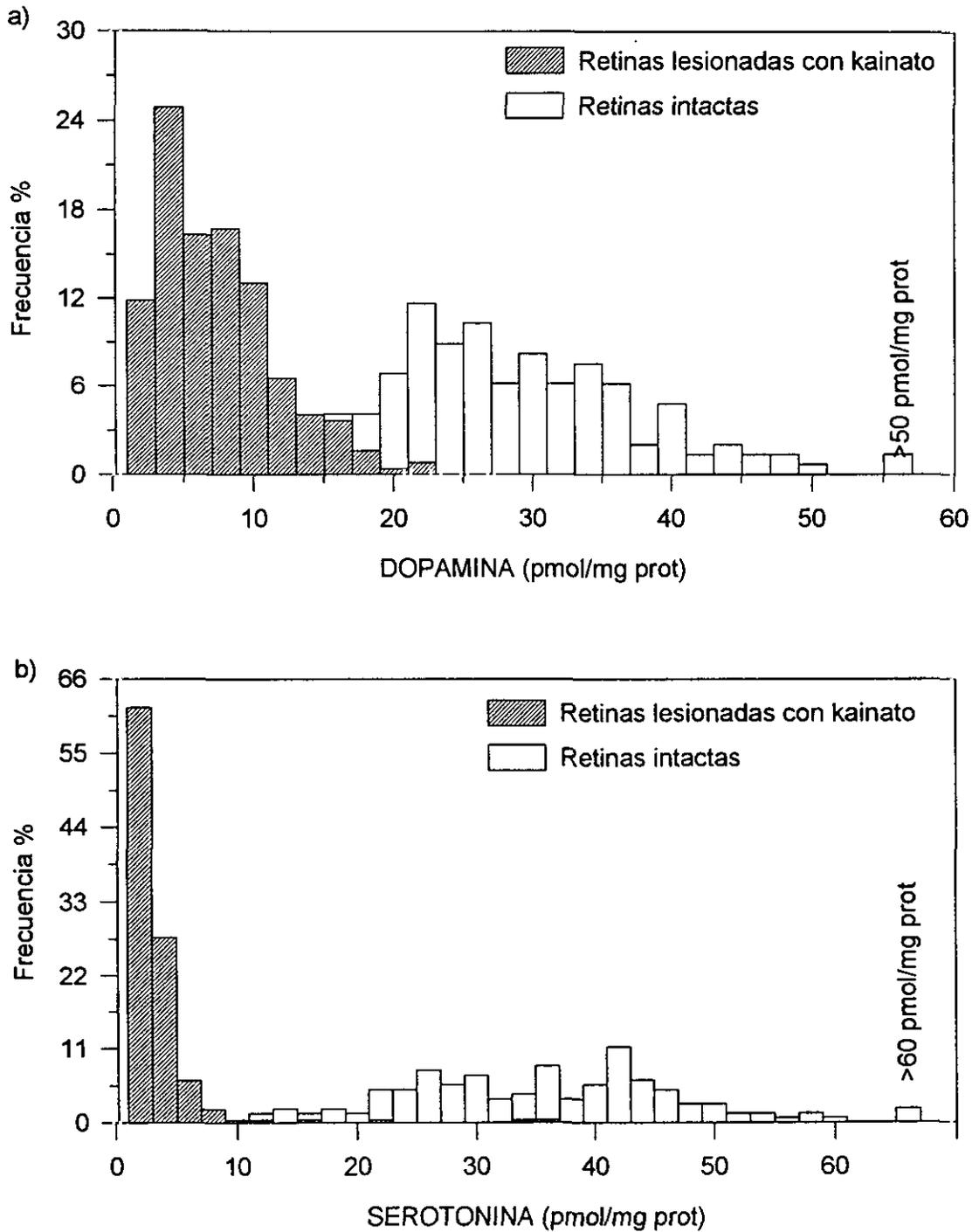
En la figura 17 se muestra la distribución de frecuencias del contenido de dopamina (Fig. 17a) y de serotonina (Fig. 17b) de retinas intactas y lesionadas con KA. Los datos representados se obtuvieron de los resultados de 9 experimentos elegidos al azar de esta memoria. La distribución de frecuencias de la dopamina y la de la serotonina se ajustan a una distribución normal en retinas intactas pero no en las lesionadas con KA. En las retinas intactas, la concentración de ambos neurotransmisores es elevada, mostrando la dopamina valores superiores a 14 pmol/mg prot. y la serotonina a 15 pmol/mg prot. (concentraciones que corresponden a sus respectivos percentiles al 5%). En las retinas lesionadas con KA, la concentración de ambos neurotransmisores es baja, no superando los 14,5 pmol/mg prot. para la dopamina y los 5,9 pmol/mg prot. para la serotonina (concentraciones que corresponden a sus respectivos percentiles al 95%).



**Esquema 9.** Valoración de la actividad TPH de las retinas de *Xenopus laevis*. a) Cromatogramas de HPLC con detección amperométrica de soluciones estándares de (25 pmol/ml). b) Cromatograma de una retina intacta y c) una retina lesionada con KA (100 nmol). En cada figura aparecen los cromatogramas de una retina basal o blanco (línea punteada) y una retina incubada durante 30 min. en presencia de mHBH (10 μM). DA, dopamina; 5-OHTrp, 5-hidroxitriptófano; ISO, isoproterenol; 5-HT, serotonina; \* Compuesto no indentificado.

Tabla 2. Contenido de serotonina y dopamina en las retinas intactas y lesionadas con KA de *Xenopus laevis* en los distintos grupos experimentales de cinco experimentos representativos. Los datos se expresan como la media aritmética  $\pm$  SEM. Entre paréntesis se muestra el porcentaje del contenido de monoaminas de los grupos lesionados con KA con respecto a los inyectados con salino.

		SEROTONINA (pmol/mg prot)				
Exp. 1	Salino	27,3 $\pm$ 3,3	28,0 $\pm$ 1,1	22,3 $\pm$ 3,4		
	Kainato	2,4 $\pm$ 0,2 (8,7%)	2,5 $\pm$ 0,5 (9%)	6,1 $\pm$ 1,5 (27,1%)		
Exp. 2	Salino	44,9 $\pm$ 6,0	38,2 $\pm$ 1,3	43,0 $\pm$ 0,5	37,6 $\pm$ 2,6	
	Kainato	3,6 $\pm$ 0,7 (8%)	3,5 $\pm$ 0,6 (9%)	4,6 $\pm$ 0,6 (10,6%)	4,3 $\pm$ 0,6 (11,4%)	
Exp. 3	Salino	21,5 $\pm$ 0,6	24,6 $\pm$ 7,0	22,2 $\pm$ 0,5	23,5 $\pm$ 2,7	
	Kainato	3,4 $\pm$ 0,9 (15,9%)	1,7 $\pm$ 0,4 (6,9%)	2,0 $\pm$ 0,3 (9,2%)	3,1 $\pm$ 0,5 (13,4%)	
Exp. 4	Salino	42,6 $\pm$ 5,4	48,4 $\pm$ 9,7	41,7 $\pm$ 3,1	35,7 $\pm$ 6,0	46,7 $\pm$ 3,7
	Kainato	5,6 $\pm$ 1,4 (13,23%)	5,0 $\pm$ 0,8 (10,3%)	3,6 $\pm$ 0,8 (8,5%)	5,3 $\pm$ 1,2 (14,9%)	4,7 $\pm$ 1,6 (10,1%)
Exp. 5	Salino	35,5 $\pm$ 4,9	25,1 $\pm$ 2,1	28,1 $\pm$ 1,3	33,3 $\pm$ 2,1	26,4 $\pm$ 5,0
	Kainato	3,1 $\pm$ 0,7 (8,7%)	4,2 $\pm$ 0,9 (16,5%)	2,4 $\pm$ 0,7 (8,4%)	2,5 $\pm$ 0,2 (7,4%)	3,1 $\pm$ 0,9 (12,0%)
		DOPAMINA (pmol/mg prot.)				
Exp. 1	Salino	33,6 $\pm$ 5,6	28,2 $\pm$ 3,4	25,1 $\pm$ 2,9		
	Kainato	3,3 $\pm$ 0,5 (9,9%)	8,3 $\pm$ 2,4 (29,4%)	5,6 $\pm$ 1,5 (22,4%)		
Exp. 2	Salino	40,6 $\pm$ 1,3	32,2 $\pm$ 2,2	32,2 $\pm$ 3,0	33,3 $\pm$ 0,6	
	Kainato	11,8 $\pm$ 2,3 (29,1%)	8,4 $\pm$ 1,6 (26,0%)	9,6 $\pm$ 2,3 (30,0%)	9,5 $\pm$ 0,3 (28,5%)	
Exp. 3	Salino	32,4 $\pm$ 5,2	23,1 $\pm$ 5,7	25,0 $\pm$ 1,6	26,1 $\pm$ 3,7	
	Kainato	12,5 $\pm$ 3,2 (38,7%)	11,2 $\pm$ 5,1 (48,5%)	9,7 $\pm$ 1,5 (38,5%)	7,8 $\pm$ 1,7 (29,89%)	
Exp. 4	Salino	52,3 $\pm$ 8,4	27,59 $\pm$ 2,7	32,9 $\pm$ 4,9	27,4 $\pm$ 1,8	28,9 $\pm$ 3,2
	Kainato	14,6 $\pm$ 2,7 (28,0%)	10,6 $\pm$ 0,4 (38,3%)	10,0 $\pm$ 0,8 (30,4%)	9,4 $\pm$ 1,7 (34,2%)	9,8 $\pm$ 0,8 (33,8%)
Exp. 5	Salino	34,4 $\pm$ 3,6	28,2 $\pm$ 1,3	21,9 $\pm$ 1,8	27,9 $\pm$ 3,2	22,3 $\pm$ 4,8
	Kainato	5,6 $\pm$ 1,4 (16,1%)	8,1 $\pm$ 1,2 (28,8%)	5,7 $\pm$ 0,5 (26,0%)	6,7 $\pm$ 1,0 (24,2%)	3,6 $\pm$ 1,2 (16,1%)



**Figura 17:** Distribución de frecuencias relativas expresadas en porcentaje del contenido de a) dopamina y b) serotonina en retinas intactas y lesionadas con KA.

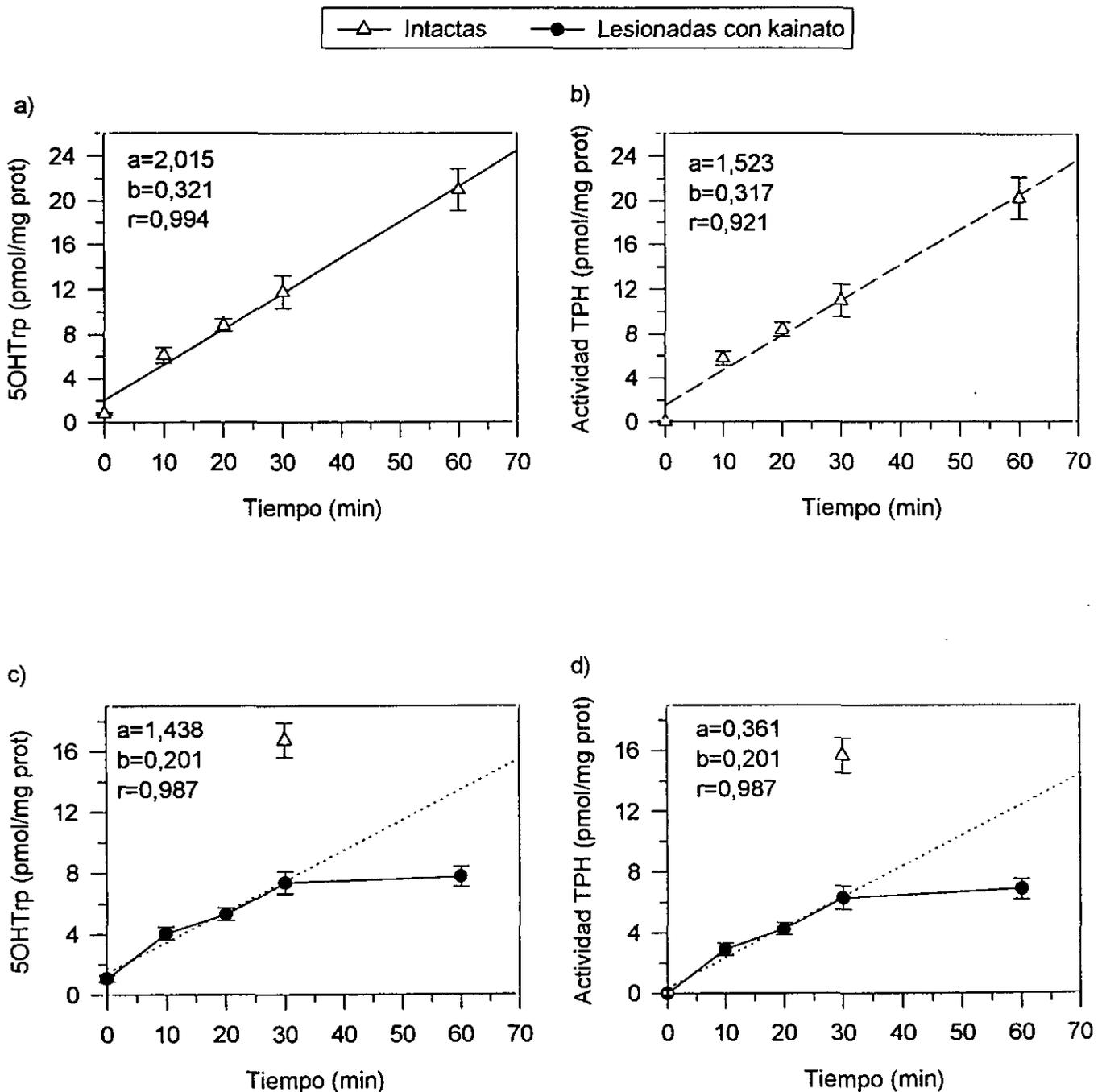
Los datos anteriores demuestran que la distribuciones de frecuencias de ambos neurotransmisores entre la retinas intactas y lesionadas con KA solapan únicamente en las colas de su distribución pudiéndose utilizar el contenido retiniano de cualquiera de ellos como marcador de la lesión ocular. Sin embargo, las distribuciones de frecuencias entre retinas intactas y lesionadas con KA en el caso de la serotonina se encuentran más distanciadas que en el caso de la dopamina pudiéndose considerar este primer neurotransmisor un marcador mejor del alcance de la lesión ocular. Por tanto, en el resto de los experimentos de esta memoria, (así como en los experimentos del apartado 2.3.3) se valorará el contenido de dopamina y serotonina retiniana en todas las muestras utilizándose el valor de los percentiles al 95% de ambos neurotransmisores en las retinas lesionadas como discriminante para determinar la eliminación de una retina de los datos experimentales debido a que la lesión ocular no ha sido completa.

### **3. ESTUDIOS SOBRE LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPTÓFANO HIDROXILASA EN COPAS ÓPTICAS LESIONADAS CON KA**

#### **3.1. REGULACIÓN POR FACTORES EXÓGENOS: EFECTO DEL FOTOPERIODO**

Una vez determinadas las condiciones óptimas de valoración de la actividad TPH pasamos a profundizar en el estudio de su regulación en los fotorreceptores retinianos de *Xenopus laevis*. Como ya habíamos comentado, la principal característica de la síntesis y liberación de melatonina es su marcado ritmo diario regulándose su perfil y duración por la luz. Por tanto, nuestro primer objetivo fue determinar los efectos del fotoperiodo sobre la actividad TPH retiniana. La actividad TPH se valoró utilizando un ensayo *in vivo*, realizándose en primer lugar los experimentos necesarios para la validación y optimización de esta técnica para la TPH de la retina de *Xenopus laevis*.

En la figura 18a y b podemos ver el desarrollo temporal de la acumulación de 5OHTrp después de la i.p. de 150 mg de mHBH/kg de peso corporal en retinas intactas. Tanto la acumulación de 5OHTrp como la actividad TPH fue lineal durante todo el tiempo estudiado, 60 minutos. Sin embargo, en las retinas lesionadas con KA (Fig. 18c y d), esta linealidad se conservó únicamente durante los 30 primeros minutos, no produciéndose una acumulación mayor de 5OHTrp pasado este tiempo. Por tanto, 30 minutos parece ser el tiempo adecuado para la



**Figura 18:** Desarrollo temporal de a) y c) la acumulación de 5OHTrp, b) y d) la actividad TPH, en retinas intactas (a y b) y lesionadas con KA (c y d) de *Xenopus laevis* tras la inyección i.p. de 150 mg/Kg de peso corporal de mHBH. Las inyecciones se realizaron en la mitad de la fase oscura del fotociclo diario (ZT18). Los animales de los que se obtuvieron las retinas lesionadas fueron inyectados intraocularmente con 50 nmol/ojo de KA una semana antes del experimento. La línea punteada muestra la recta de regresión a la que se ajusta el contenido de 5OHTrp y la actividad enzimática durante los primeros 30 min. de reacción.

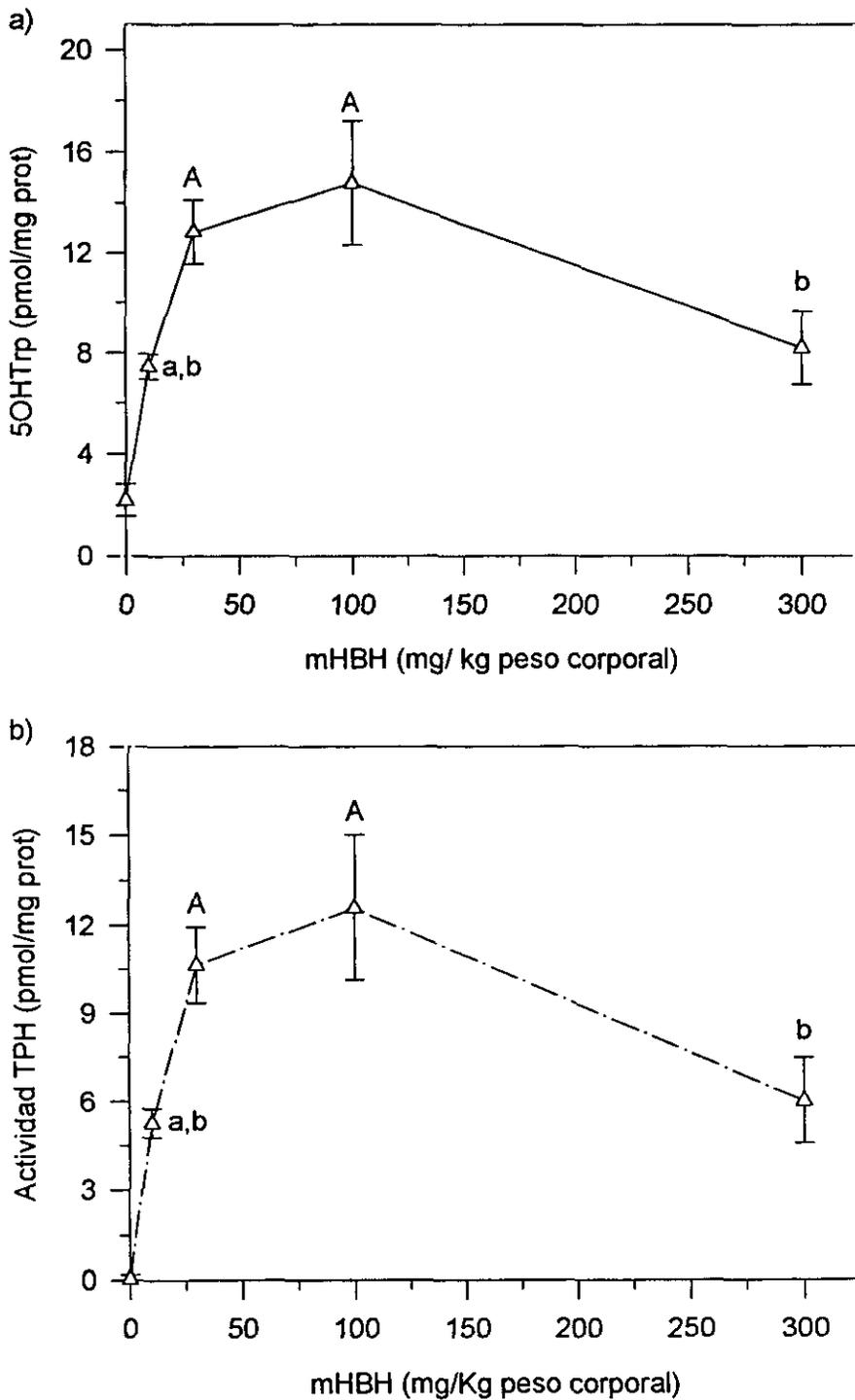
valoración de la actividad TPH en ambos tipos de retinas utilizándose en el resto de los experimentos de este apartado.

Una vez determinado el tiempo de la reacción, se estudió la dosis óptima de mHBH requerida. En la figura 19 observamos que la mayor acumulación de 5OHTrp tuvo lugar cuando la dosis de mHBH inyectada estuvo comprendida entre 30 y 100 mg/kg de peso corporal, obteniéndose una menor acumulación de este indol tanto a dosis inferiores como superiores. Por tanto, la dosis de mHBH escogida para el resto de los experimentos de valoración de TPH *in vivo* fue de 100 mg/kg peso corporal.

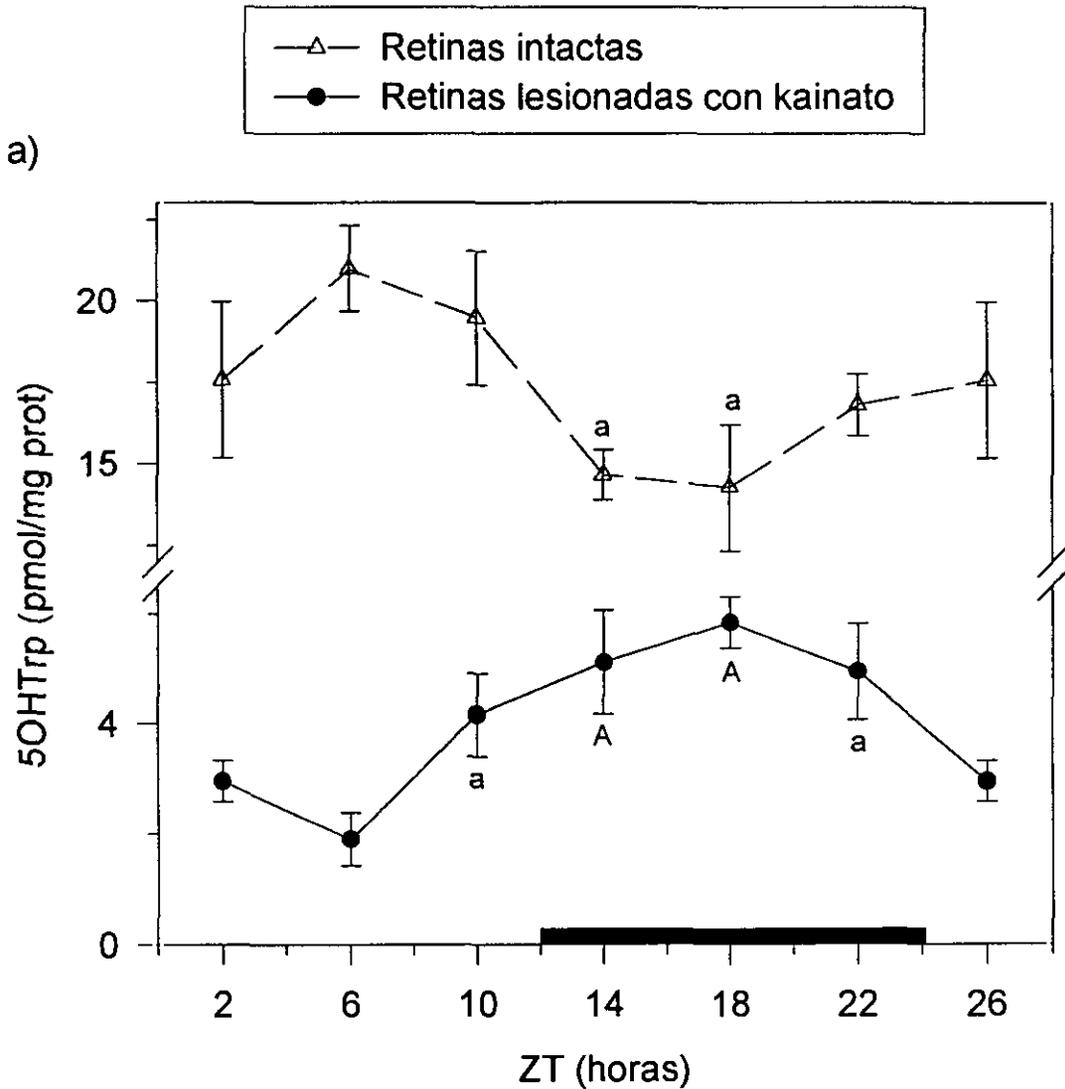
Es interesante señalar que el tiempo postinyección, 30 minutos, y la dosis de mHBH, 100 nmol/kg de peso corporal, encontrados como óptimos para la determinación de la actividad enzimática en la retina de *Xenopus laevis* están en el rango de las utilizadas por otros autores en la valoración de la actividad TPH de la retina de pollo (Thomas e Iuvone, 1991), en la glándula pineal (Steinlechner, 1983) y el cerebro (Carlson *et al.*, 1972; Tappaz y Pujol, 1980; Miwa *et al.*, 1985; Hashiguchi *et al.*, 1993; Poncet *et al.*, 1993) de mamíferos.

Así mismo, es importante destacar que en los 3 experimentos anteriores los niveles basales de 5OHTrp (ya sean a tiempo cero o con la inyección de salino) fueron en todos los casos muy cercanos al límite de detección analítico. Por tanto, para la realización del ritmo diario de la actividad TPH se utilizaron únicamente animales inyectados con mHBH, no siendo necesaria la utilización de grupos blanco.

En la figura 20 se muestra el ritmo diario de la acumulación de 5OHTrp después de 30 minutos de la inyección i.p. de 100 mg de mHBH/Kg de peso corporal en retinas intactas y lesionadas con KA. Ambos tipos de retinas mostraron un ritmo diario de actividad que se ajusta a una función sinusoidal (Tabla 3). Sus acrofases tuvieron lugar en puntos distintos del fotociclo, cercano a la medianoche (ZT18) para las retinas enriquecidas en fotorreceptores y al mediodía (ZT6) para las retinas intactas. Así mismo, el cociente máximo/mínimo del ritmo de las retinas enriquecidas en fotorreceptores es mucho mayor que en las intactas. Finalmente, comparando los valores medios entre ambos tipos de retinas encontramos que la actividad TPH localizada en los fotorreceptores es un 13% de la actividad TPH total de la retina.



**Figura 19:** Dosis-respuesta de la inyecciones i.p. de mHBH sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas intactas de *Xenopus laevis*. El tiempo de reacción fue de 30 minutos. Las inyecciones se realizaron en la mitad de la fase oscura del fotociclo diario (ZT18). Las letras indican las significaciones estadísticas: minúsculas,  $p < 0,05$ , mayúsculas  $p < 0,01$ . A, vs el blanco; b, vs el grupo tratado con 100 mg/Kg peso corporal.



**Figura 20:** Ritmo diario del contenido de 5OHTrp en retinas intactas y lesionadas con KA. Una semana antes del experimento los animales fueron inyectados intraocularmente en un ojo con salino y en otro con 50 nmol de KA. El día del experimento, los animales fueron inyectados i.p. con 100 mg/Kg de peso corporal de mHBH, siendo decapitados 30 minutos después. La barra oscura indica la fase oscura del fotociclo diario. Las letras indican las significaciones estadísticas: minúsculas,  $p < 0,05$ , mayúsculas,  $p < 0,01$ . A, vs las retinas extraídas durante la fase luminosa del fotociclo.

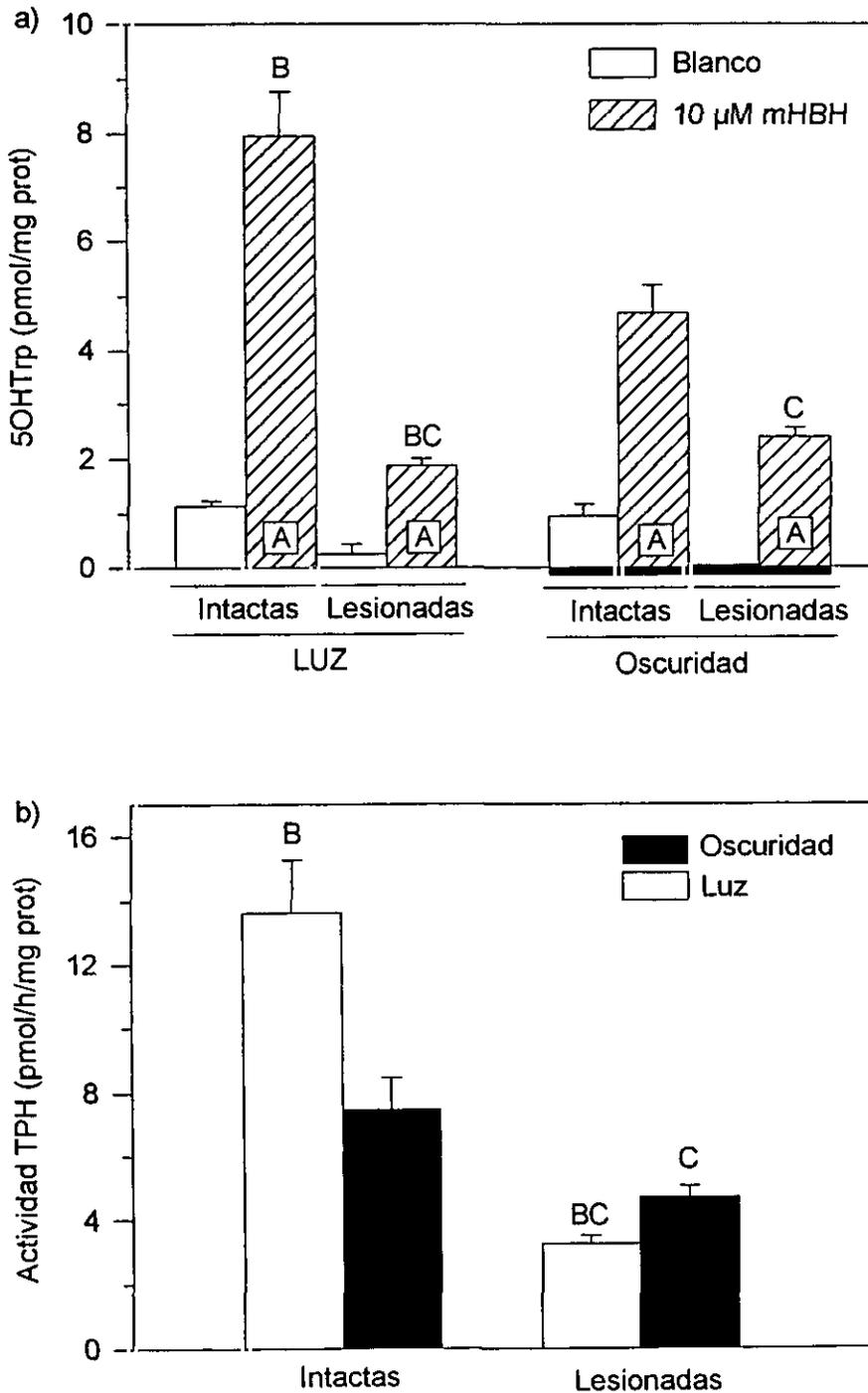
**Tabla 3:** Parámetros de la función sinusoidal ajustada a los valores experimentales obtenidos en el ritmo diario de la actividad TPH de las retinas de *Xenopus laevis* inyectados intraocularmente con solución salina ó 50 nmol de KA una semana antes de la obtención de las retinas.

Grupo	Nivel medio ( $A_0 \pm SE$ ) (pmol/mg prot)	Amplitud ( $A_1 \pm SE$ ) (pmol/mg prot)	Cociente Ruido/Señal ( $SE_{A_1}/A_1$ )	Acrofase ( $\varphi \pm SE$ ) (ZT hr)	Max/Min
Salino	17,53 ± 0,66	3,47 ± 0,91	0,26*	5,47 ± 1,04	1,49
Kainato	4,18 ± 0,25	1,85 ± 0,35	0,19*	17,01 ± 0,74	2,59

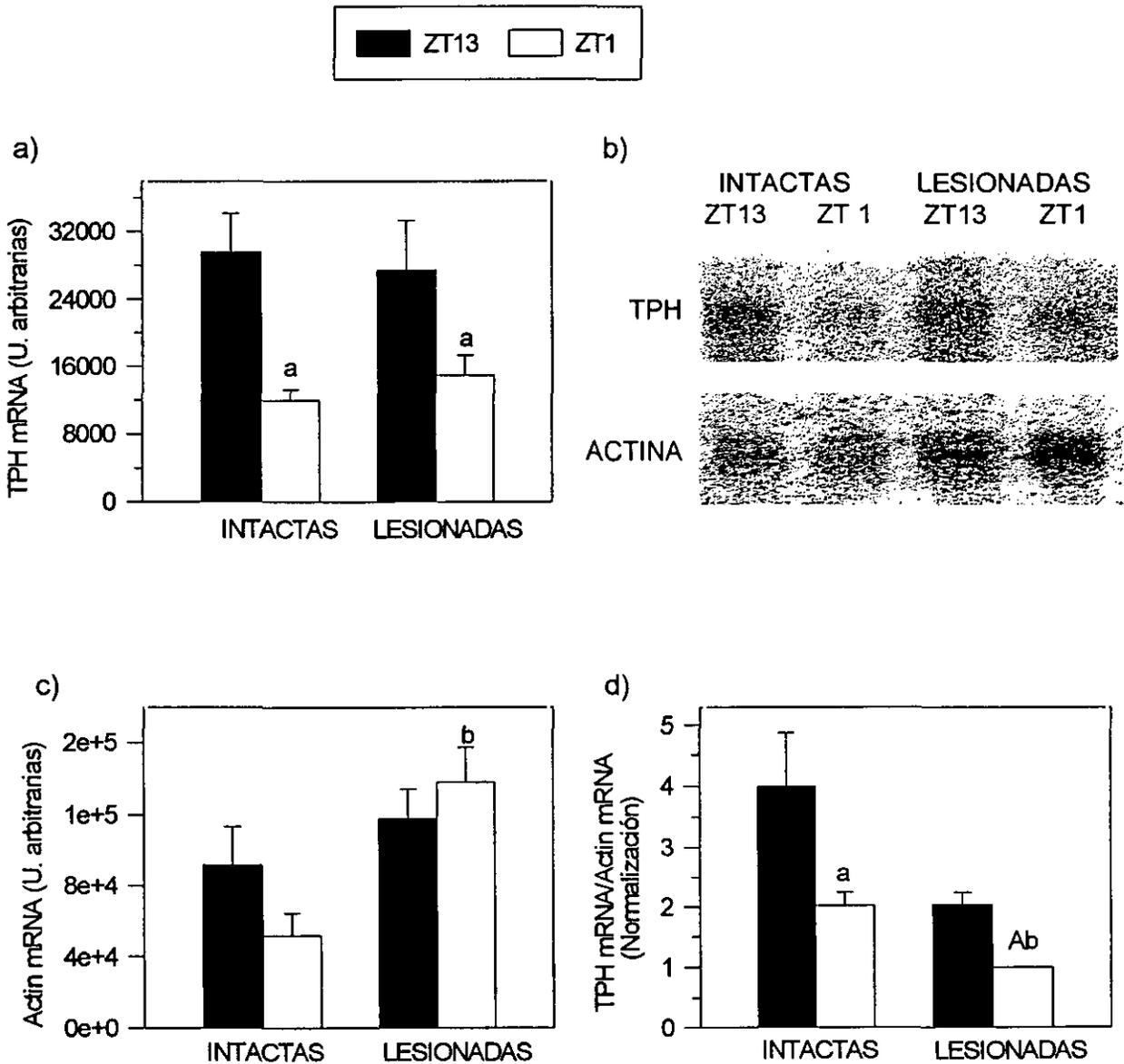
\* El ritmo es significativo (ruido/señal < 0,3)

Este efecto regulador de la luz sobre la actividad TPH se confirma en los experimentos *in situ*. De este modo, tras 4 horas de cultivo en luz u oscuridad se observa que las copas ópticas cultivadas en oscuridad presentan una mayor acumulación de 5OHTrp y actividad TPH que las cultivadas en luz en las retinas lesionadas con KA (Fig. 21a y b). En las retinas intactas, por el contrario y en concordancia con los datos obtenidos *in vivo* en el experimento anterior, las copas ópticas cultivadas en luz muestran una mayor acumulación de 5OHTrp y de actividad TPH.

Para confirmar este carácter rítmico de la TPH retiniana se valoró las variaciones de su mRNA en dos momentos del ciclo diario (Fig. 22). Para ello, los animales se sacrificaron al inicio de la fase oscura y luminosa, procediéndose inmediatamente a la extracción y determinación de los niveles de mRNA de la TPH y la actina. El gen de la TPH se expresa de forma idéntica en las retinas intactas y lesionadas con KA, encontrándose en ambos tipos de retinas una mayor cantidad de mRNA de la TPH al inicio de la fase oscura (ZT13) que al inicio de la fase luminosa (ZT1) (Fig. 22a). El gen de la actina no muestra ninguna oscilación diaria pero sus valores son ligeramente superiores en las retinas lesionadas con KA que en las intactas (Fig. 22c). Por tanto, al normalizar el contenido de mRNA de la TPH por el de la actina las retinas lesionadas con KA muestran unos valores de expresión de la TPH aproximadamente de la mitad de las retinas intactas (Fig. 22d). De este modo, los niveles del mRNA de la actina no son un buen parámetro normalizador cuando se quieren comparar retinas intactas y lesionadas con KA, ya que la lesión ocular aumenta la expresión de la actina posiblemente debido a fenómenos asociados a la reparación tisular.



**Figura 21:** Contenido de 5OHTrp (a) y actividad TPH (b) de retinas intactas o lesionadas con KA (100 nmol/ojo) después de 4 horas de cultivo en SC en luz o en oscuridad. El tiempo de reacción fue de 30 minutos. La concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción fue de 1 mM para las retinas intactas y de 250 μM para las retinas lesionadas con KA. Las letras mayúsculas indican la significaciones estadísticas  $p < 0,01$ . A, vs los grupos blancos; B, vs los grupos cultivados en oscuridad; C, vs las retinas intactas.



**Figura 22:** Contenido de mRNA de a) la TPH y c) actina en retinas intactas y lesionadas con KA de animales sacrificados al inicio de la fase luminosa (ZT1) y la fase oscura (ZT13). En d) se representa el contenido de mRNA de la TPH normalizado por el del mRNA de la actina. En b) se muestra la hibridación de las sondas para la TPH y la actina en un dato representativo de cada grupo experimental. Las letras indican las significaciones estadísticas: minúsculas  $p < 0,05$ , mayúsculas  $p < 0,01$ . a, vs ZT13; b, vs intactas.

### **3.2. REGULACIÓN ENDÓGENA: PAPEL DE LOS SEGUNDOS MENSAJEROS**

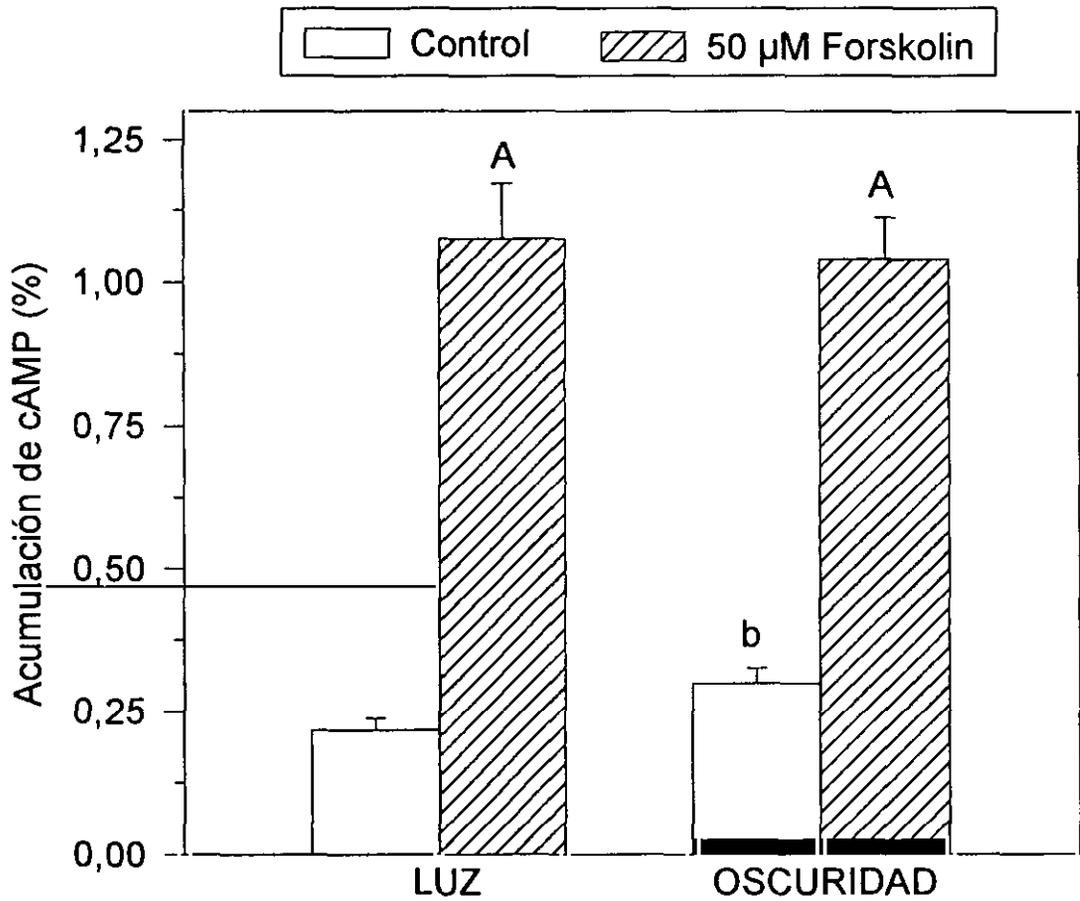
En todos los experimentos de este apartado de la memoria se utilizó un cultivo de copas ópticas lesionadas con KA. Si no se indica lo contrario, el cultivo se realizó en luz durante 4 horas coincidiendo con la noche subjetiva del animal (ZT12→ZT16). Como parámetros de control de la lesión ocular se valoró el contenido de dopamina y serotonina. Cuando una retina lesionada con KA mostró niveles elevados de ambos parámetros y superiores a los criterios fijados en el apartado 2.4 (percentiles al 95% de ambos neuromoduladores), se consideró como una lesión ocular incompleta no utilizándose ni los niveles del contenido de 5OHTrp ni de la actividad TPH de la misma para el análisis estadístico. En la mayoría de los casos no se encontraron diferencias en el contenido de estos parámetros entre los distintos grupos experimentales de cada experimento.

#### **3.2.1. REGULACIÓN POR cAMP**

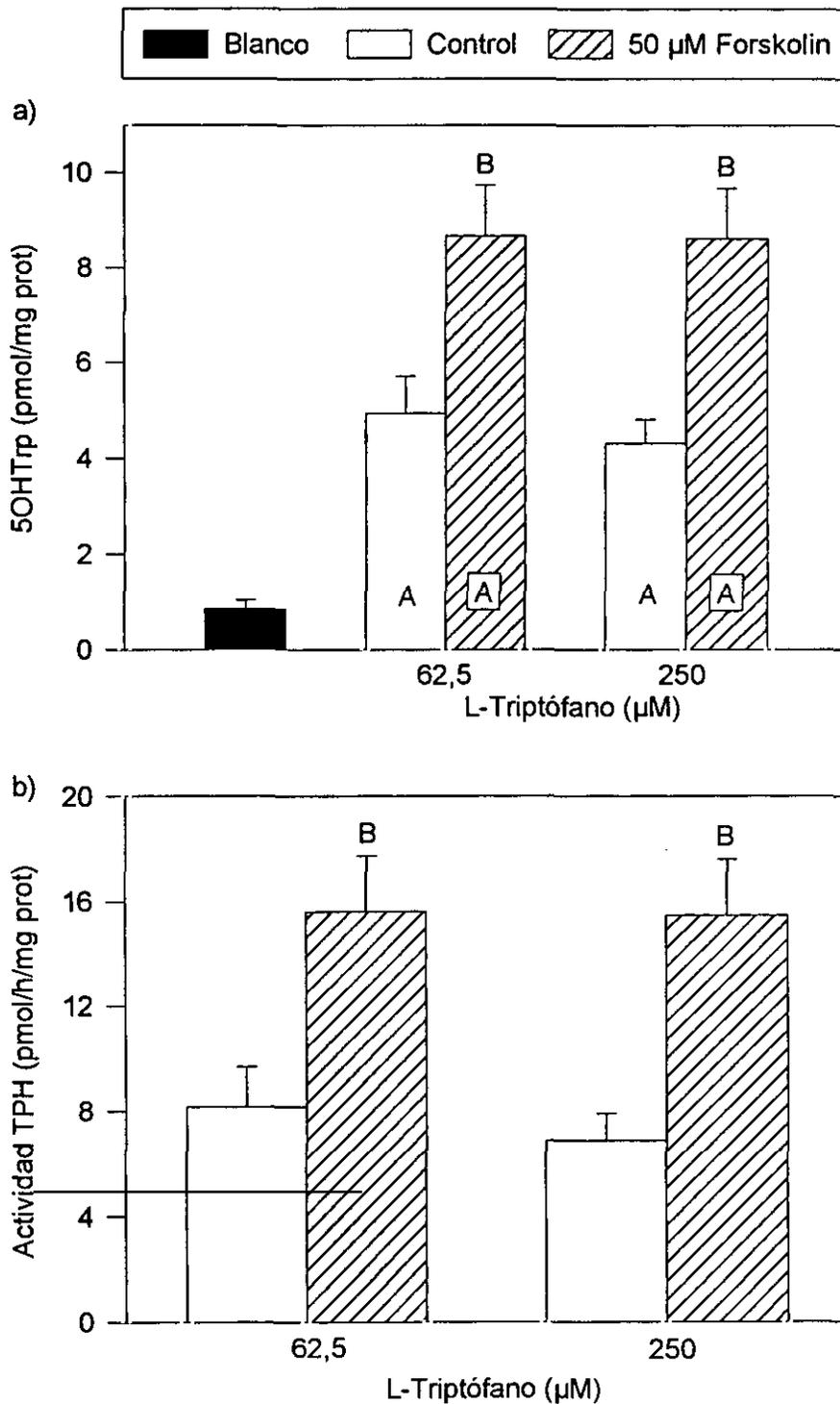
El forskolin es un diterpeno cuya acción como activador de la AC ha sido ampliamente demostrada, siendo una herramienta farmacológica muy utilizada para el estudio de los efectos del cAMP en las células. En primer lugar, se comprobó el efecto del forskolin sobre la acumulación de cAMP en los fotorreceptores de *Xenopus laevis*. En la figura 23 se muestra que en un cultivo de copas ópticas lesionadas con KA la acumulación basal de cAMP en luz fue significativamente menor que en oscuridad. Es más, el forskolin (50  $\mu\text{M}$ ) estimuló la acumulación de cAMP en ambas condiciones de iluminación. Estos resultados confirman que el forskolin a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  puede ser utilizado como un estimulador farmacológico de los niveles de cAMP celulares.

##### **a) Efecto del incremento de la concentración intracelular de cAMP sobre la actividad TPH retiniana.**

En el apartado 2.3 se demostró que los requerimientos de la reacción para la retinas intactas son muy distintos que los de las retinas lesionadas con KA, especialmente respecto a la concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción. Por tanto, la utilización de una concentración baja de L-Trp nos permite favorecer la actividad enzimática presente en los fotorreceptores frente a la que pueda quedar en las escasas neuronas serotoninérgicas que sobrevivan después de la lesión. Por tanto, el objetivo del siguiente experimento fue doble: por un lado, comprobar si variaciones en el contenido de cAMP intracelular provocaban variaciones



**Figura 23:** Efecto de la adición de forskolin (50 μM) sobre la acumulación de cAMP en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Las copas ópticas fueron cultivadas por 4 horas en luz o en oscuridad en presencia de [<sup>3</sup>H]adenina (4 μCi) previamente al comienzo de la reacción. A  $p < 0,01$  vs control; b  $p < 0,05$  vs los grupos cultivados en luz.

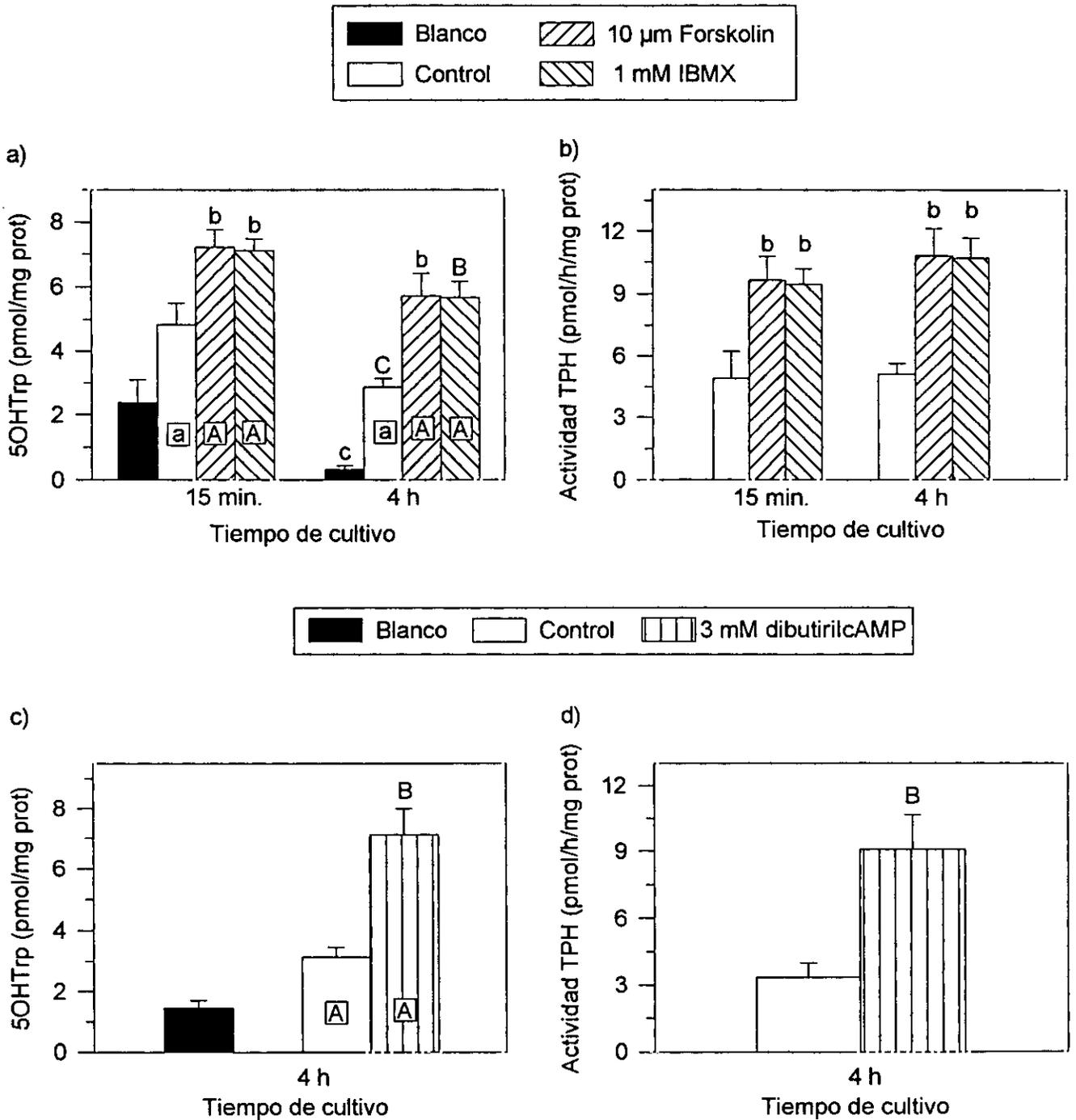


**Figura 24:** Efecto de la adición de forskolin (50 μM) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del 10 μM de mHBH, las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos y la concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción la indicada en el eje de abscisas. A,  $p < 0,01$  vs al grupo blanco; B,  $p < 0,01$  vs al grupo control.

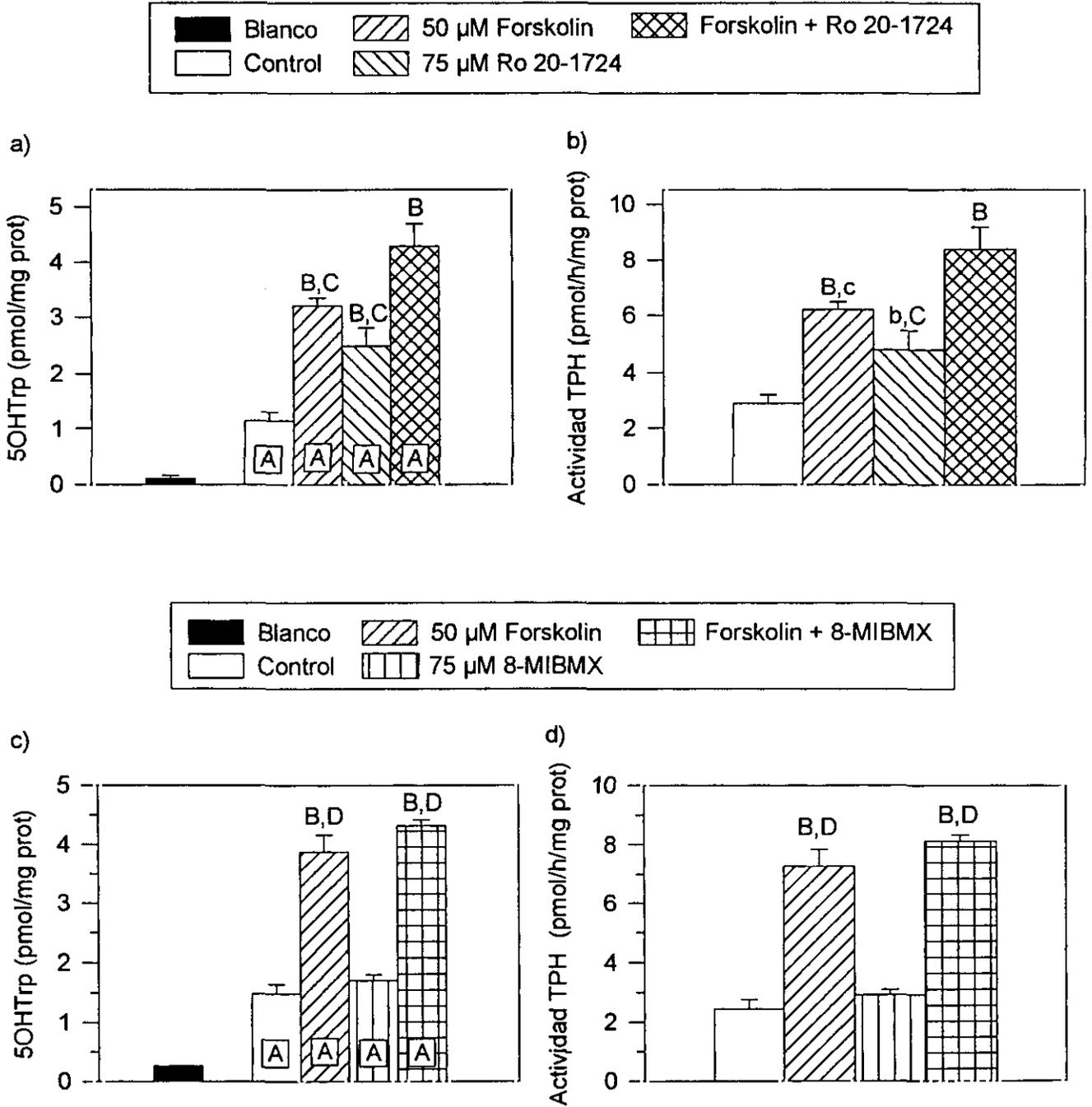
en la actividad enzimática y por otro ver si concentraciones distintas de L-Trp (62,5  $\mu\text{M}$  ó 250  $\mu\text{M}$ ) afecta a la actividad TPH. En la figura 24 podemos observar que la adición durante 4 horas de un activador de la adenilato ciclasa, forskolin, provocó una duplicación en el contenido de 5OHTrp (Fig. 24a) y la actividad enzimática (Fig. 24b) respecto al control. Este efecto se observó a las dos concentraciones de L-Trp utilizadas, indicando que una concentración baja de L-Trp no altera la magnitud de la respuesta de los fotorreceptores al cAMP. Por tanto, para el resto de los experimentos de esta memoria se utilizará una concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción de 62,5  $\mu\text{M}$ .

Para confirmar que un incremento en el contenido de cAMP intracelular induce una estimulación de la actividad TPH, las copas ópticas se cultivaron en presencia de un inhibidor general de fosfodiesterasas, isobutilmetilxantina (IBMX, 1 mM). Tanto a tiempo de cultivo de 15 min como de 4 horas, el IBMX y el forskolin (10  $\mu\text{M}$ ) produjeron un incremento significativo de la acumulación del contenido retiniano de 5OHTrp (Fig. 25a) y de la actividad TPH (Fig. 25b). Estos resultados sugieren que, al menos parte de los efectos regulatorios del cAMP sobre la actividad TPH, están mediados por mecanismos rápidos que suceden durante los primeros minutos de la estimulación. Entre los mecanismos de regulación rápidos pueden incluirse la fosforilación. Nuestro siguiente objetivo fue determinar si los efectos del cAMP sobre la actividad TPH están mediados por la PKA. En la figura 25c se muestra que la adición de un activador de la PKA, dibutilil-cAMP (3 mM) estimuló la acumulación de 5OHTrp y la actividad TPH respecto al control, confirmando el importante papel jugado por la PKA en la regulación de la actividad TPH.

Una vez demostrado que un aumento del contenido intracelular de cAMP, provocado al inhibir su degradación, produce una estimulación de la actividad TPH (Fig. 25b), nos planteamos estudiar qué tipos de fosfodiesterasas de cAMP están interviniendo en la regulación de la actividad TPH. En la figura 26a y b observamos que la adición de un inhibidor específico de las fosfodiesterasas de tipo IV, Ro20-1724 (75  $\mu\text{M}$ ), indujo una estimulación del contenido de 5OHTrp y de la actividad TPH comparable a la obtenida con forskolin. La administración conjunta de ambos fármacos produjo una estimulación aditiva de la actividad TPH. Sin embargo, la adición de un inhibidor de las fosfodiesterasas de tipo I, 8-MIBMX, no tuvo ningún efecto ni sobre la acumulación de 5OHTrp ni sobre la actividad TPH, tanto en ausencia como en presencia



**Figura 25:** Efecto de la adición de forskolin (50  $\mu$ M), IBMX (1 mM) y dibutiril-cAMP (3 mM) sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del 10  $\mu$ M de mHBH las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 15 minutos ó 4 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos y la concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción de 62,5  $\mu$ M. Las letras muestran las significaciones estadísticas: minúsculas  $p < 0,05$ ; mayúsculas  $p < 0,01$ ; a, vs grupo blanco; b, vs grupo control; c, vs el grupo cultivado 15 minutos.



**Figura 26:** Efecto aditivo del inhibidor de PDE tipo IV, Ro 20-1724 (75  $\mu\text{M}$ ), y tipo I, 8-MIBMX (75  $\mu\text{M}$ ) y del forskolin (50  $\mu\text{M}$ ) sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente, a la adición del mHBH (10  $\mu\text{M}$ ) las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, concentración de L-Trp 62,5  $\mu\text{M}$ . Las letras muestran las significaciones estadísticas indicando las minúsculas  $p < 0,05$  y las mayúsculas  $p < 0,01$ ; A, vs el grupo blanco; b, vs el grupo control; c, vs el grupo tratado con forskolin y Ro 20-1724; D, vs el grupo tratado con 8-MIBMX.

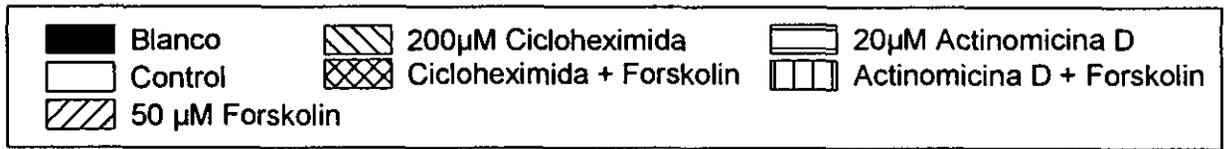
de forskolin (Fig. 26c y d). Esos resultados sugieren que las fosfodiesterasas de tipo IV son las isoenzimas implicadas principalmente en la regulación de los niveles de cAMP responsables de la regulación de la actividad TPH.

### **b) Mecanismos de regulación implicados en el efecto del cAMP sobre la actividad TPH**

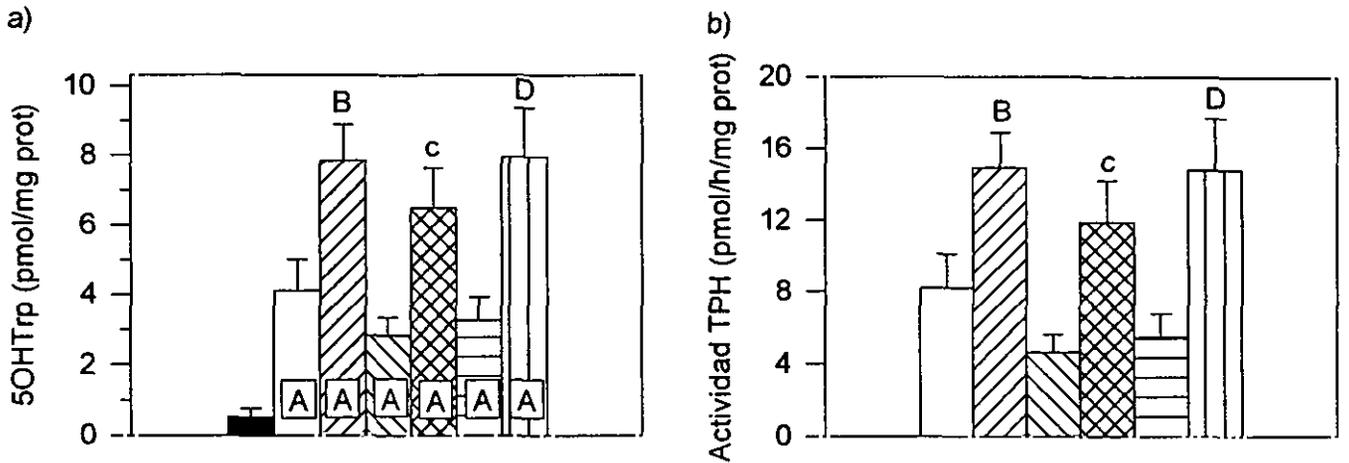
Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si los efectos del cAMP sobre la actividad TPH también estaban mediados por mecanismos de regulación más lentos que la fosforilación de proteínas, como los procesos de activación génica. Para ello, las copas ópticas se cultivaron durante 6 horas con forskolin en presencia o ausencia de un inhibidor de la transcripción génica (la actinomicina D) y uno de la traducción de proteínas (cicloheximida). En la figura 27 a y b podemos ver que la adición de forskolin indujo un aumento al doble del contenido de 5OHTrp y de la actividad TPH respecto al control. Sin embargo, ni la adición de actinomicina D ni de cicloheximida modificó la actividad enzimática, no siendo tampoco capaces de bloquear el efecto estimulador del forskolin. Cuando el cultivo se realizó entre ZT0→ZT6 se obtuvo el mismo resultado (Fig. 27 c y d), indicando que los fotorreceptores retinianos no muestran una sensibilidad variable a lo largo del día con respecto al cAMP.

Con el fin de conocer si las concentraciones utilizadas de actinomicina D y cicloheximida en los experimentos anteriores eran adecuadas para inhibir la transcripción y traducción en las retinas lesionadas durante el cultivo de las copas ópticas se repitió el experimento valorando la síntesis *de novo* de proteínas. Para ello se determinó la incorporación de [<sup>3</sup>H]leucina a las proteínas recién sintetizadas. En la figura 28 se observa que en presencia de cicloheximida la síntesis *de novo* de proteínas fue prácticamente nula. La adición de actinomicina D también provocó una disminución significativa de la síntesis proteica (70 % respecto al grupo control). El efecto de ambos fármacos no se modificó por la presencia de forskolin en el medio de cultivo.

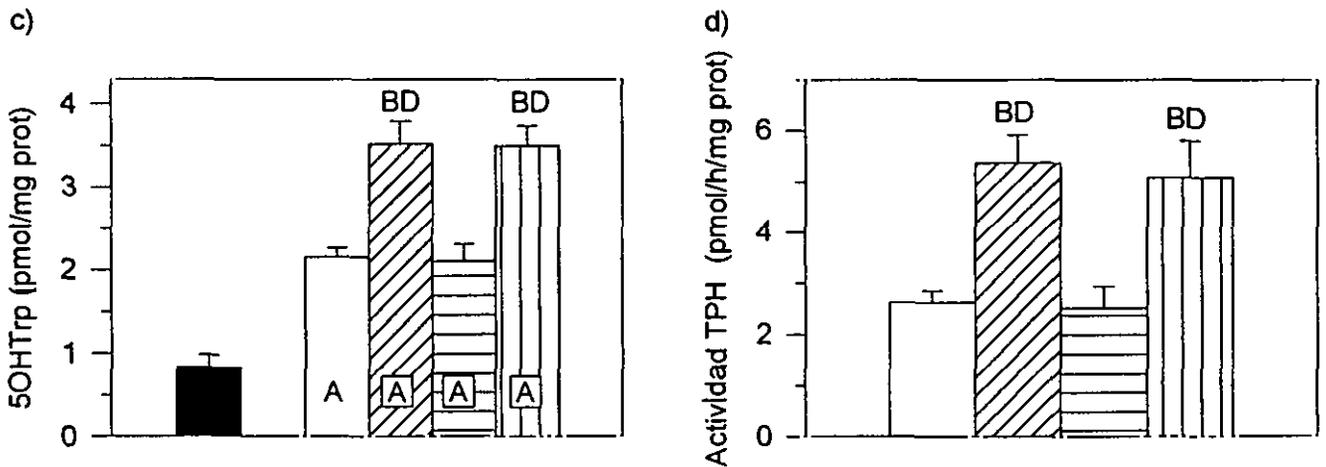
En las figuras 29 y 30 observamos que independientemente del momento del ciclo diario, el forskolin no fue capaz de modificar los niveles del mRNA de la TPH, mientras que la adición de actinomicina D los redujo a niveles casi indetectables, excluyendo cualquier efecto del cAMP sobre la expresión del gen de la TPH, así como sobre la vida media del mRNA de la TPH. Aunque los niveles de mRNA de la actina se ven reducidos ligeramente por la adición de Actinomicina D,



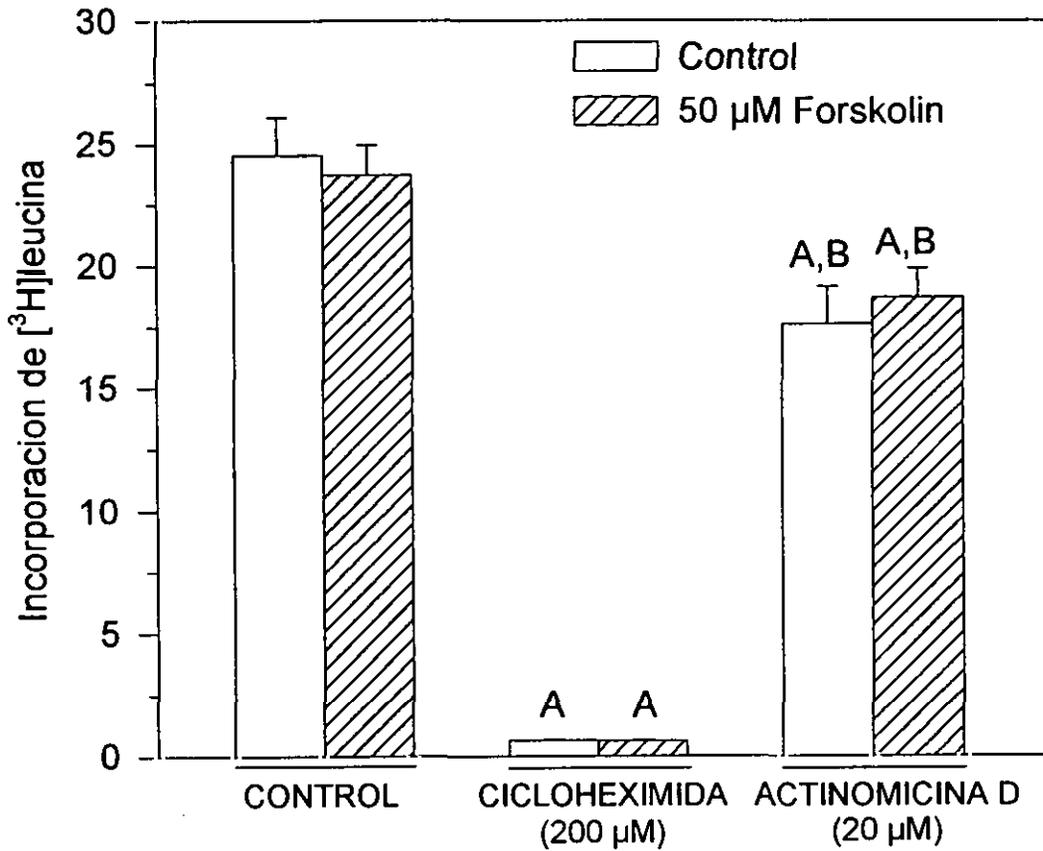
COPAS ÓPTICAS CULTIVADAS ENTRE ZT12 Y ZT18



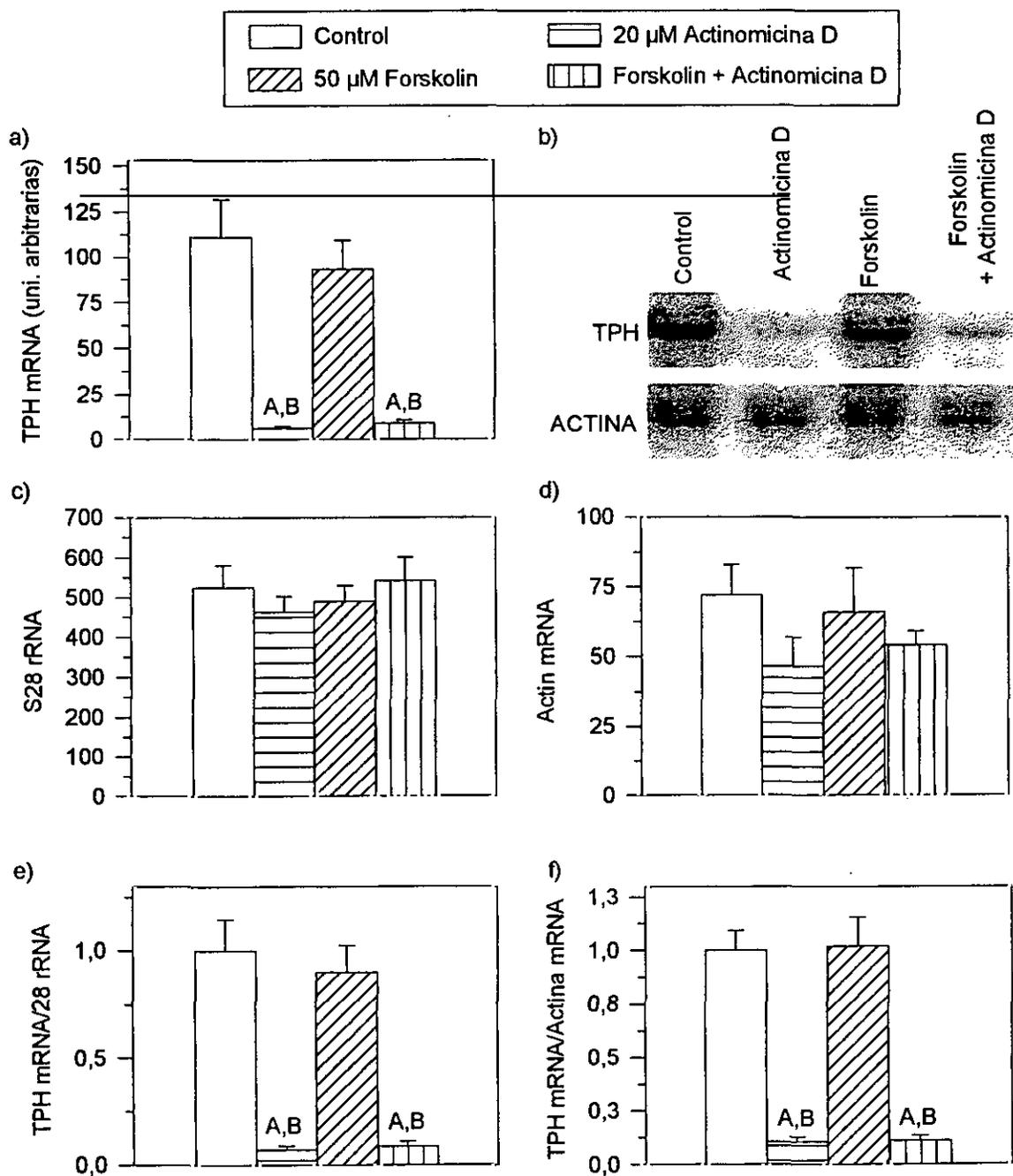
COPAS ÓPTICAS CULTIVADAS ENTRE ZT0 Y ZT6



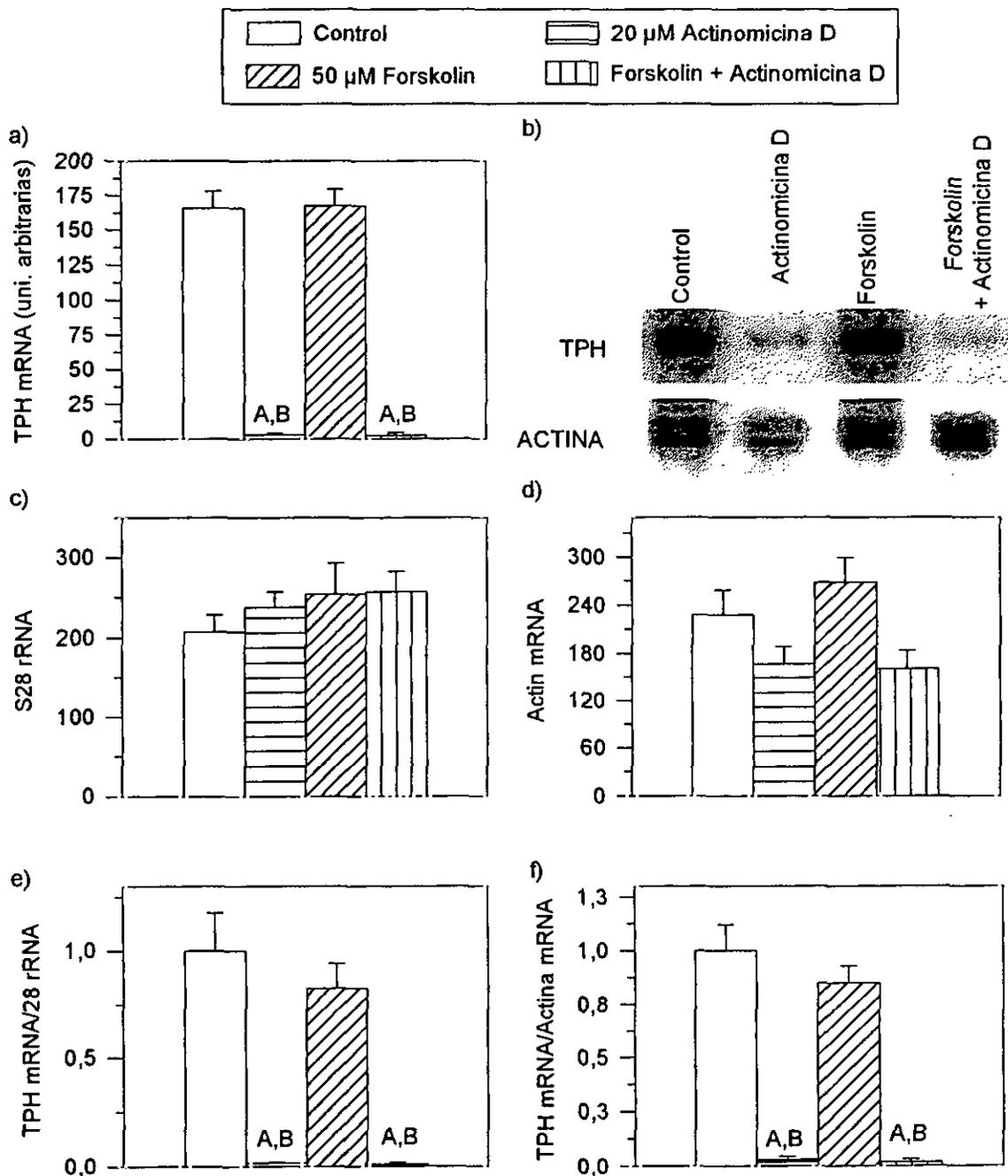
**Figura 27:** Efecto del forskolin (50 µM), la actinomicina D (20 µM) y la cicloheximida (200 µM) sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10 µM) las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 6 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, la concentración de L-Trp 62,5 µM. Las letras muestran las significaciones estadísticas indicando las minúsculas p<0,05 y las mayúsculas p<0,01; A, vs el grupo blanco; B, vs el grupo control; c, vs el grupo tratado con cicloheximida; d, vs el grupo tratado con actinomicina D.



**Figura 28:** Efecto del forskolin (50 µM), la actinomicina D (20 µM) y la cicloheximida (200 µM) sobre la incorporación de [<sup>3</sup>H]leucina en las proteínas de retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición de la [<sup>3</sup>H]leucina, las copas ópticas se cultivaron en SC durante 6 horas en luz. El tiempo de marcaje fue de 1 hora. A, p<0,01 vs el grupo control; B, p<0,01 vs el grupo tratado con cicloheximida.



**Figura 29:** Efecto del forskolin (50  $\mu$ M) y la actinomicina D (20  $\mu$ M) sobre a) el mRNA de la TPH c) el rRNA 28S y d) mRNA de la actina. Las copas ópticas se cultivaron en presencia de los fármacos durante 6 horas en luz (inicio del cultivo ZT12). En b) se muestra la hibridación de las sondas de TPH y actina de un dato representativo de cada grupo experimental. En las gráficas e) el cociente TPH mRNA/28S rRNA y f) el cociente TPH mRNA/Actina mRNA, se representa la media aritmética y el error estandar de los distintos grupos normalizados respecto al grupo control. Las letras mayúsculas indican las significaciones estadísticas  $p < 0,01$ . A vs el grupo control; B vs el grupo tratado con forskolin.



**Figura 30:** Efecto del forskolin (50  $\mu$ M) y la actinomicina D (20  $\mu$ M) sobre a) el mRNA de la TPH b) el rRNA 28S c) mRNA de la actina. Las copas ópticas se cultivaron en presencia de los fármacos durante 6 horas en luz (inicio del cultivo ZT0). En b) se muestra la hibridación de las sondas de la TPH y la actina de un dato representativo de cada grupo experimental. En las gráficas e) el cociente TPH mRNA/28S rRNA y f) el cociente TPH mRNA/Actina mRNA, se representan la media aritmética y el error estandar de los distintos grupos normalizados respecto al grupo control. Las letras mayúsculas indican las significaciones estadísticas  $p < 0,01$ . A vs el grupo control; B vs el grupo tratado con forskolin.

en todos los grupos encontramos valores homogéneos de rRNA 28S como cabría esperar ya que se cargó la misma cantidad de RNA total por muestra. Por lo tanto, no hay grandes diferencias en los resultados del mRNA de la TPH, tanto si se normalizan respecto al mRNA de la actina, como respecto al rRNA S28.

### 3.2.2. REGULACIÓN POR CALCIO

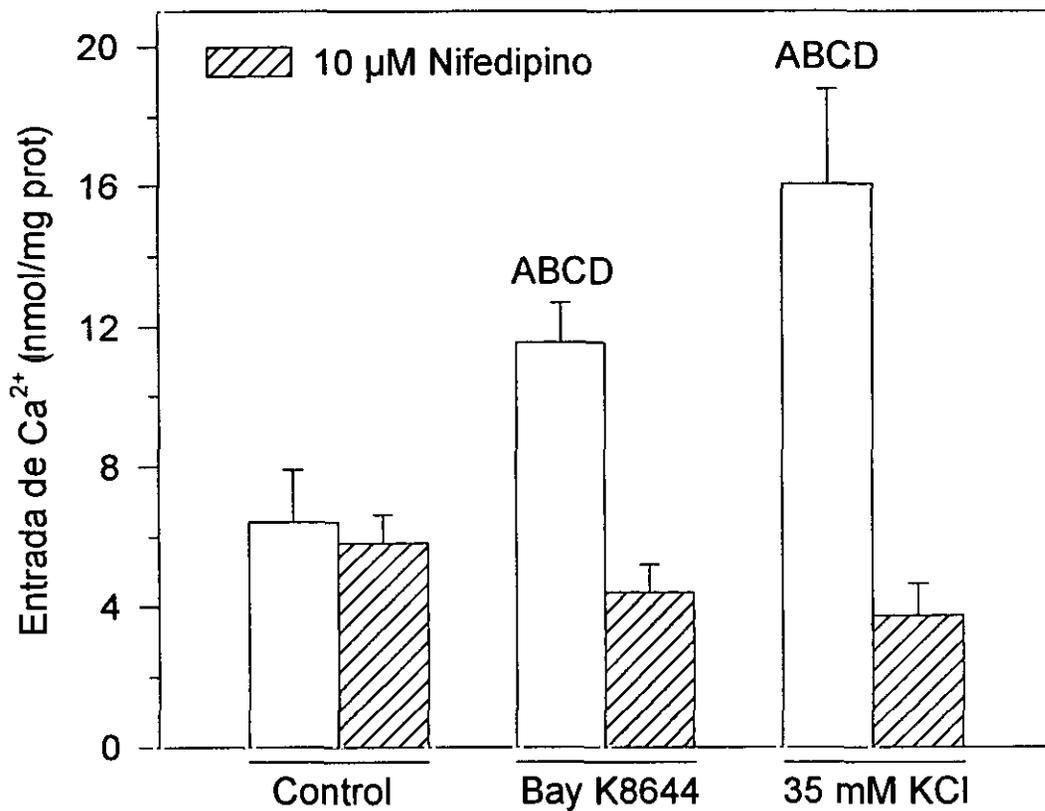
De forma similar que para el estudio de la regulación de la actividad TPH por cAMP, nuestro primer objetivo de este apartado de la memoria fue comprobar si los tratamientos farmacológicos elegidos para estudiar el papel regulador del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la actividad TPH, estaban realmente modificando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el fotorreceptor y, por tanto, variando la concentración intracelular de este segundo mensajero. En la figura 31 se observa que tanto la despolarización del fotorreceptor con 35 mM KCl como la adición del agonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a dihidropiridinas, Bay K8644 (5  $\mu\text{M}$ ), estimularon la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  evaluada como entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Ambas estimulaciones fueron bloqueadas totalmente por la adición del bloqueante de dichos canales, nifedipino (10  $\mu\text{M}$ ), indicando que son los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a dihidropiridinas tipo L los principales responsables de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el fotorreceptor.

#### a) Importancia del calcio en la regulación de la actividad TPH

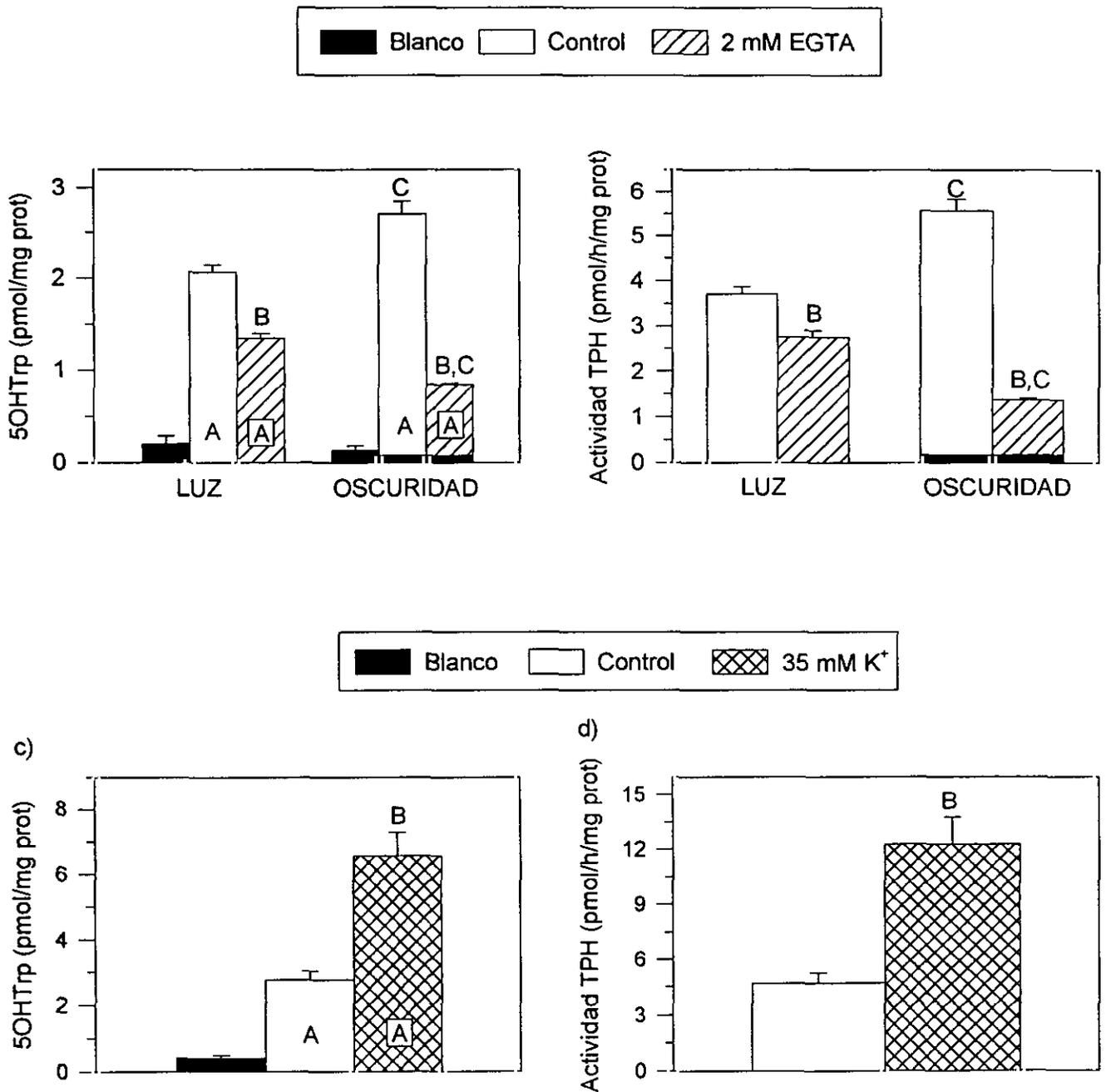
En la figura 32a y b se observa que la adición de 2 mM EGTA (por tanto, la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular) provocó una reducción muy marcada de la acumulación del contenido de 5OHTrp y de la actividad TPH, tanto cuando el cultivo se realizó en luz (74% respecto al control) como en oscuridad (20% respecto al control), indicando que la regulación de la actividad TPH es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así mismo, la despolarización de los fotorreceptores con 35 mM de KCl, con la consiguiente apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, provocó una estimulación de la acumulación de 5OHTrp y la actividad TPH (261% respecto al control) (Fig. 32c y d), mimetizando el efecto de la oscuridad sobre la actividad enzimática.

#### b) Tipo de canales de calcio implicados en la regulación de la actividad TPH

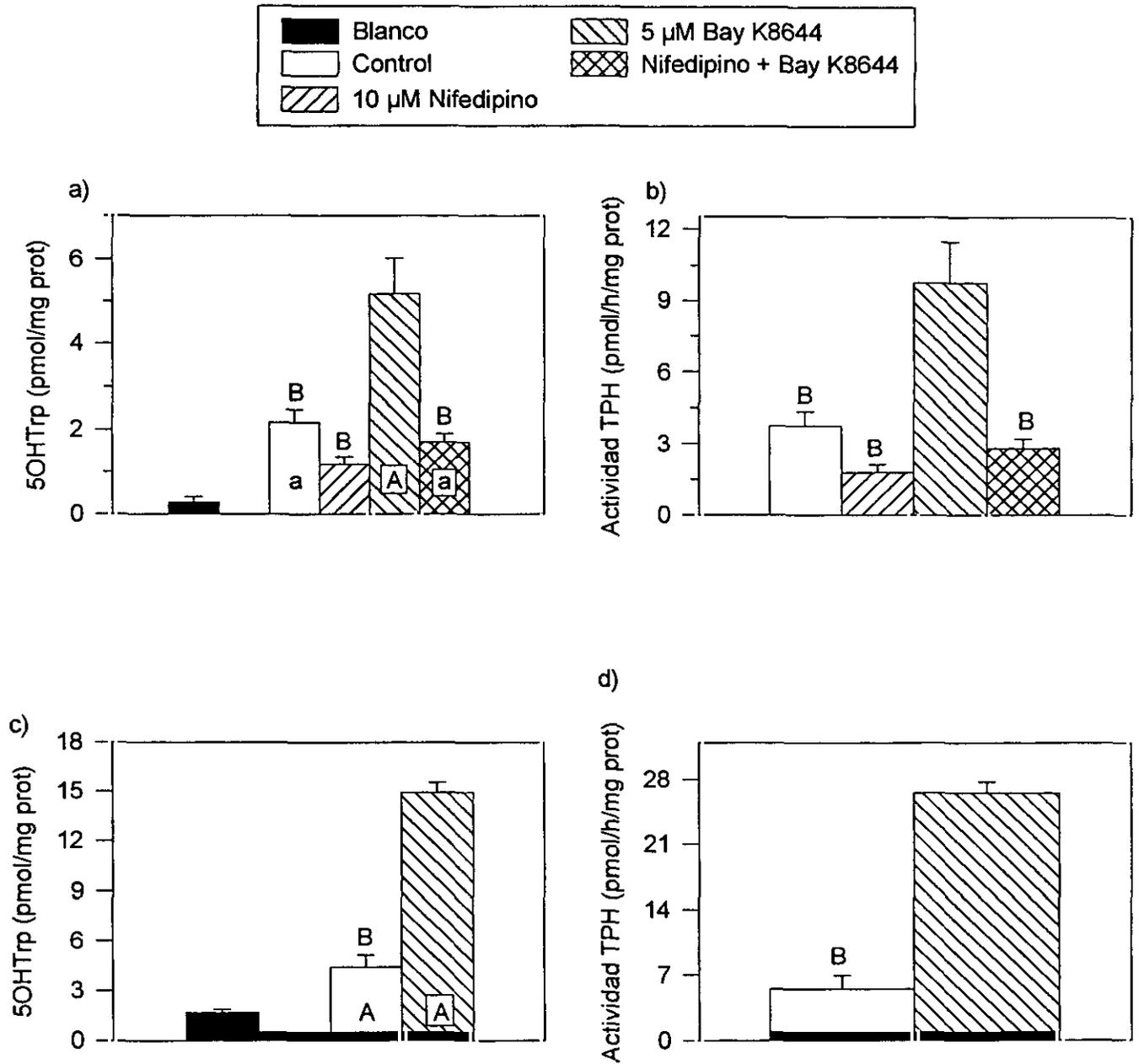
Una vez determinada la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulación de la actividad TPH, nos planteamos estudiar qué tipos de canales de calcio estaban implicados en la regulación de la actividad TPH. La adición de un activador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, Bay K8644 (5  $\mu\text{M}$ ), provocó un aumento notable del contenido de 5OHTrp (Fig. 33a y c) y la actividad TPH (Fig. 33b



**Figura 31:** Efecto del agonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, Bay K8644 ( $5 \mu\text{M}$ ) y la despolarización del fotorreceptor con KCl ( $35 \text{ mM}$ ) sobre la entrada de calcio en las retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Las letras muestran las significaciones estadísticas indicando las minúsculas  $p < 0,05$  y las mayúsculas  $p < 0,01$ ; A vs el grupo blanco; B vs el grupo control; C vs el grupo tratado con Bay k 8644 y nifedipino; D vs el grupo tratado con KCl ( $35 \text{ mM}$ ) y nifedipino.



**Figura 32:** Efecto del quelante de Ca<sup>2+</sup>, EGTA (2 mM) y la despolarización del fotorreceptor con KCl (35 mM) sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del 10 μM de mHBH las copas ópticas fueron cultivadas en SC con 25 μM de L-Trp durante 4 horas en luz o en oscuridad. El tiempo de reacción fue de 30 minutos y concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción de 62,5 μM. Las letras muestran las significaciones estadísticas indicando las minúsculas p<0,05 y las mayúsculas p<0,01; A, vs el grupo blanco; B, vs el grupo control; c, vs cultivo en luz.



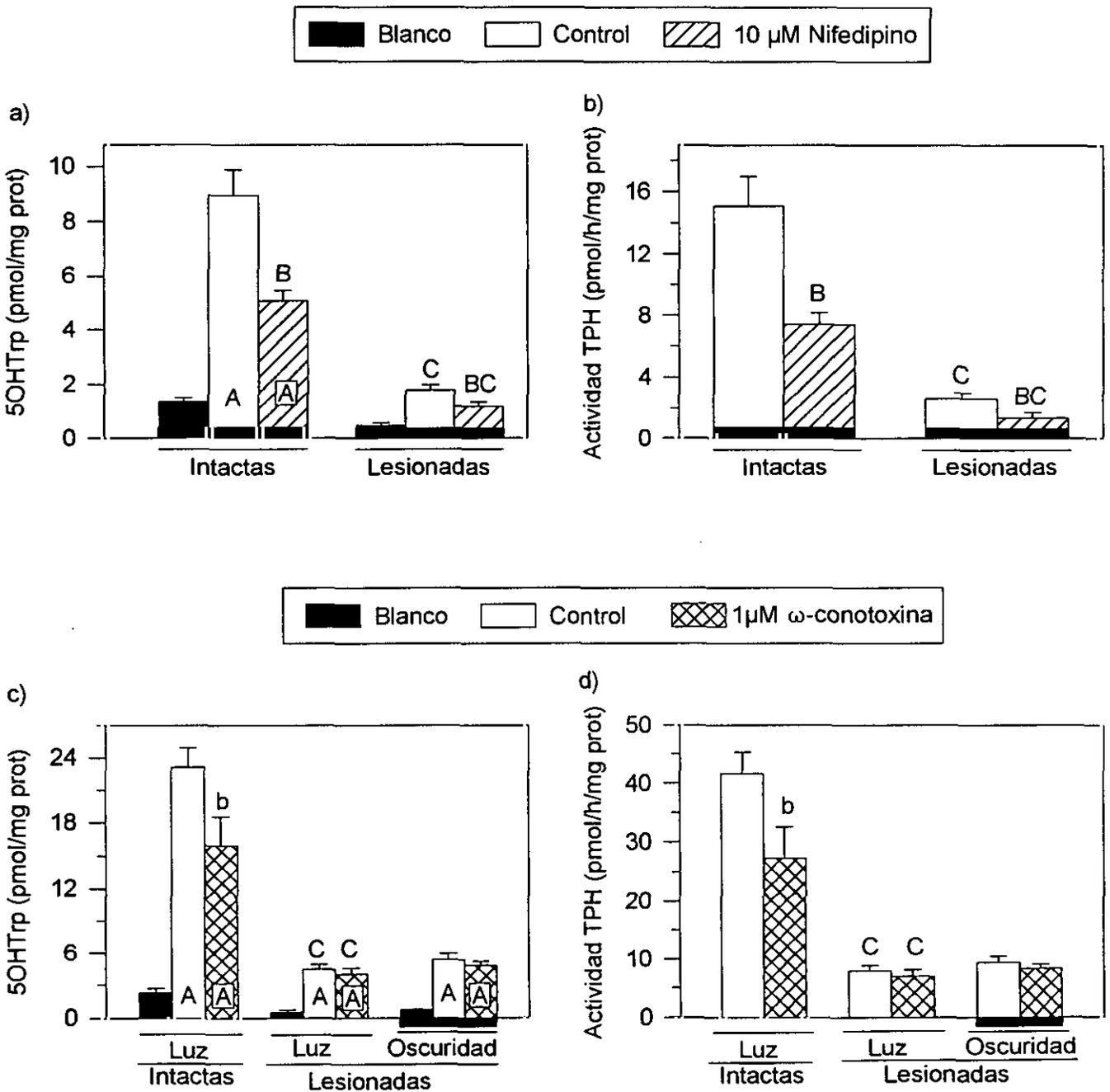
**Figura 33:** Efecto del antagonista, nifedipino (10  $\mu$ M), y el activador, Bay K8644 (5 $\mu$ M) de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu$ M) las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz o oscuridad (barra oscura). El tiempo de reacción fue de 30 minutos, la concentración de L-Trp fue de 62,5  $\mu$ M. Las letras indican la significaciones estadísticas: minúsculas p<0,05; mayúsculas p<0,01. A vs el grupo blanco; B vs el grupo tratado con Bay K8644.

y d) independientemente de que el cultivo se realizara en luz o en oscuridad. La especificidad de este efecto a través de canales tipo L se comprobó utilizando un bloqueante específico de este tipo de canales, el nifedipino. En un cultivo en luz, la adición de nifedipino (10  $\mu\text{M}$ ) bloqueó totalmente el efecto estimulador del Bay K8644 sobre la acumulación de 5OHTrp (Fig. 33a) y la actividad TPH (Fig. 33b).

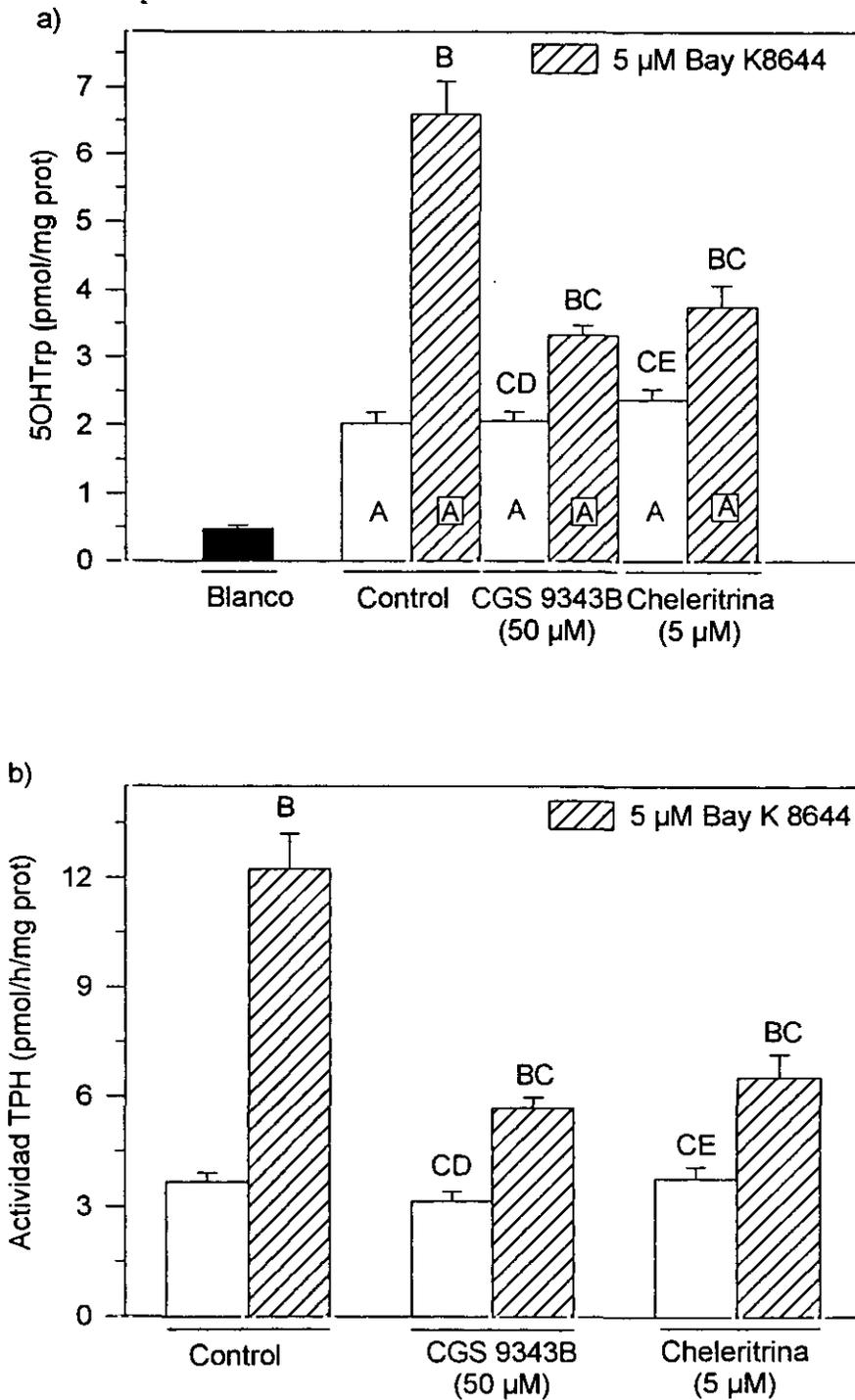
El papel de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L en la regulación de la actividad TPH se confirma en un experimento en oscuridad. En dichas condiciones, la adición de nifedipino (10  $\mu\text{M}$ ) provocó una disminución de la acumulación de 5OHTrp (Fig. 34a) y la actividad TPH (Fig. 34b) procedente tanto de retinas lesionadas con KA como intactas (53% y 49% del control respectivamente), sugiriendo que la apertura de los canales de calcio tipo L es un requisito necesario para que se mantengan los niveles nocturnos de actividad TPH elevados. Sin embargo, la adición de un bloqueante de canales de calcio tipo N,  $\omega$ -conotoxina (1  $\mu\text{M}$ ), no tuvo ningún efecto sobre la acumulación de 5OHTrp y la actividad TPH de las retinas lesionadas con KA pero provocó una disminución de la misma en las retinas intactas (Fig. 34d). Estos resultados indican que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N, aunque modifican la actividad TPH presente en las neuronas serotoninérgicas, no intervienen en la regulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  del fotorreceptor, y por tanto, en la regulación de la actividad TPH.

### **c) Vías de transmisión de la señal implicadas en la regulación por $\text{Ca}^{2+}$ de la actividad TPH**

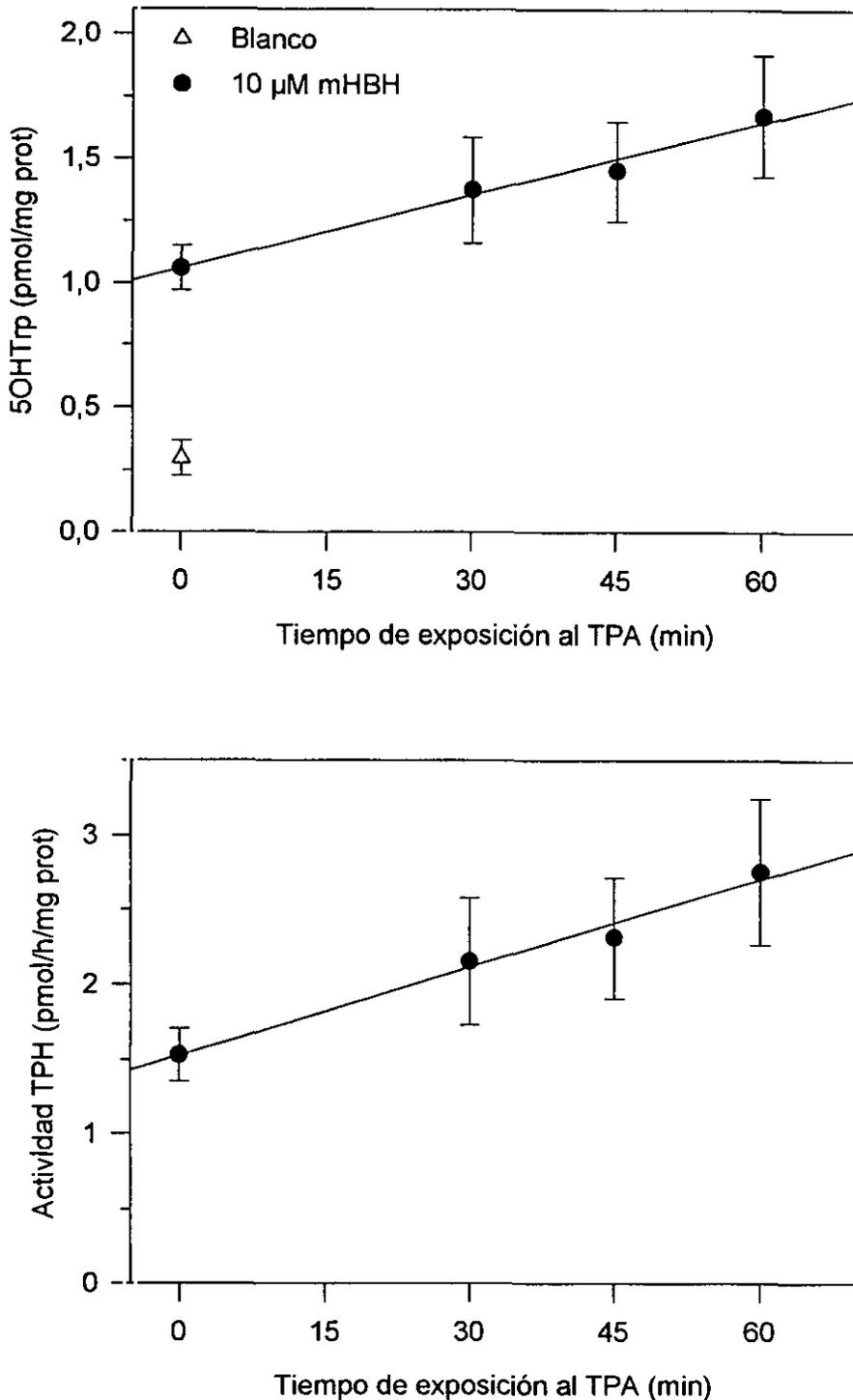
Nuestro siguiente objetivo fue determinar cuáles de las múltiples vías de transmisión intracelular dependientes de calcio estaban implicadas en la regulación de la actividad TPH. En la figura 35 observamos que el efecto estimulador del Bay K8644 sobre la acumulación del 5OHTrp (Fig. 35a) y la actividad TPH (Fig. 35b) se bloqueó parcialmente por el antagonista de la calmodulina, CGS 4393B (50  $\mu\text{M}$ ), y el inhibidor específico de la PKC, cheleritrina (5  $\mu\text{M}$ ), sugiriendo que estas vías dependientes de calcio intervienen en la regulación de la actividad TPH. El papel de modulador positivo de la PKC se confirma en la figura 36, donde se observa que la adición de un activador de dicha quinasa, forbol-12-miristato-13-acetato (TPA, 200 nM), estimuló la acumulación de 5OHTrp y la actividad TPH de una manera dependiente del tiempo. En un experimento posterior en el que se preincubó con el TPA durante 30 minutos (Fig. 37a y b), el efecto estimulador del TPA sobre la acumulación de 5OHTrp y la actividad TPH desaparece en



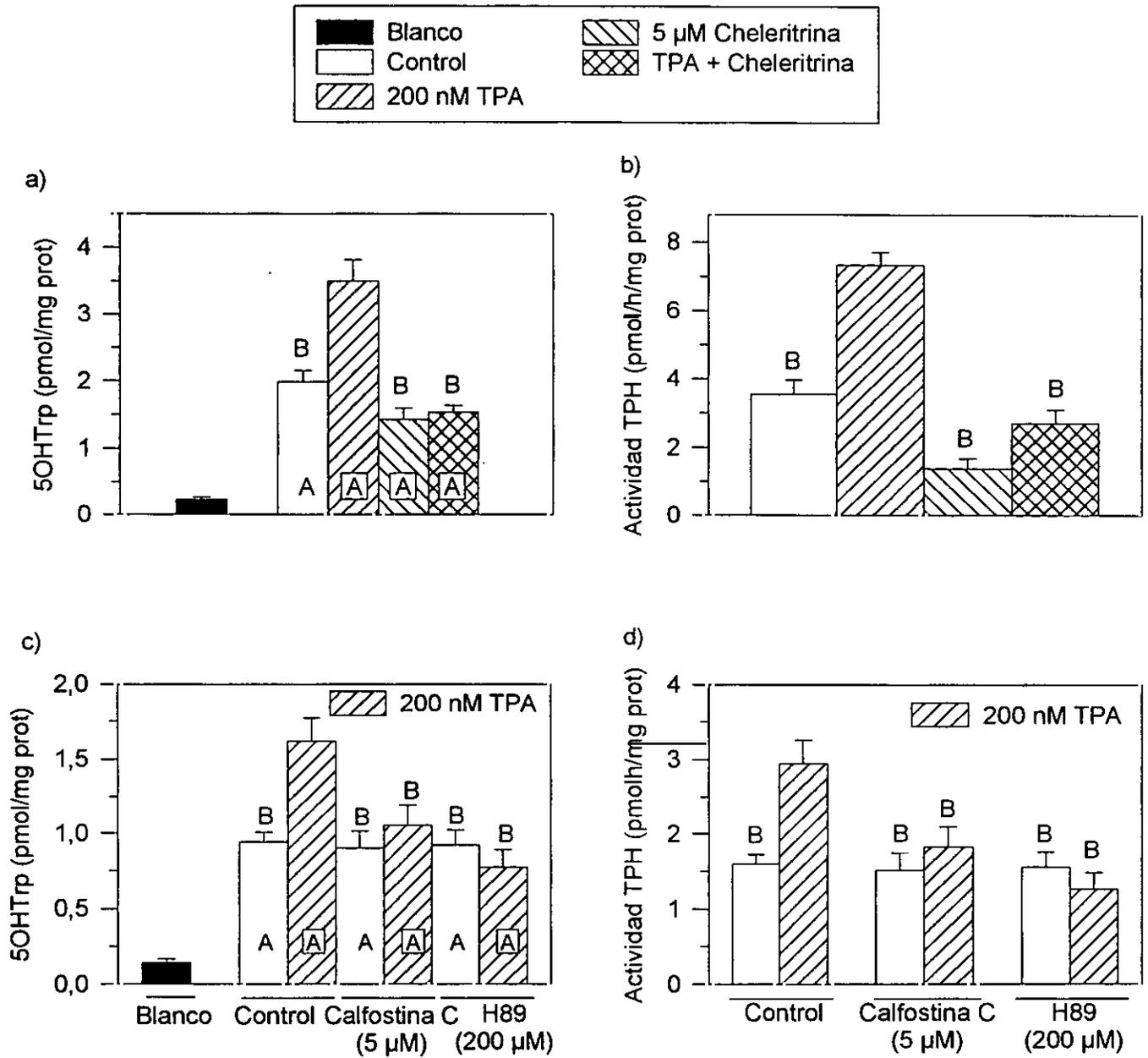
**Figura 34:** Efecto de los antagonistas de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, nifedipino (10 μM) y tipo N, ω-conotoxina (1 μM), sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas intactas y lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10 μM) las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz o oscuridad (grupos con la barra negra en la base). El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp (62,5 μM). Las letras muestran las significaciones estadísticas: minúsculas  $p < 0,05$ , mayúsculas  $p < 0,01$ ; a, vs el grupo blanco; B, vs el grupo control; C, vs las retinas intactas.



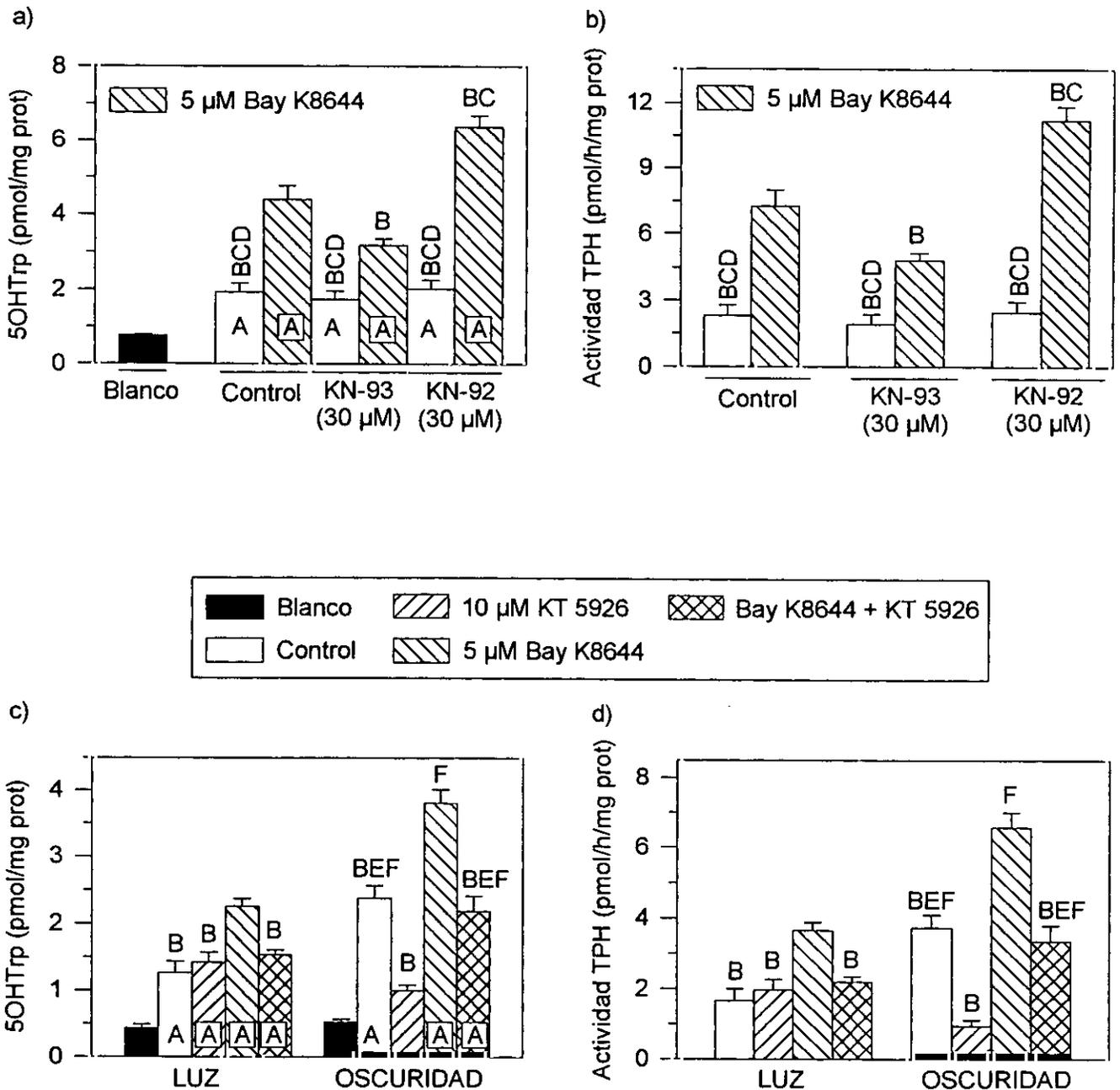
**Figura 35:** Efecto del inhibidor del complejo calcio-calmodulina, CGS 9343B (50  $\mu$ M), y del inhibidor de la PKC, Chelerritrina (5  $\mu$ M) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu$ M), las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, la concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción fue 62,5  $\mu$ M. Las letras indican las significaciones estadísticas ( $p < 0,01$ ): A, vs el grupo blanco; B, vs el grupo control; C, vs el grupo tratado con Bay K8644; D, vs el grupo tratado con CGS 9343B y Bay K8644; E, vs el grupo tratado con chelerritrina y Bay K8644.



**Figura 36:** Efecto del activador de la PKC, forbol-12-miristato-13-acetato, TPA (200 nM) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del TPA las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 1 hora en luz. En el eje de abscisas se indica el tiempo de preincubación con TPA antes del comienzo de la reacción. El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp (62,5 μM).



**Figura 37:** Efecto del activador de la PKC, TPA (200 nM), el inhibidor de la PKC, Chelitrina (5  $\mu$ M), y el inhibidor de la PKA, H89 (200  $\mu$ M) sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del TPA las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 1 hora en luz, añadiéndose el TPA 30 minutos antes del comienzo de la reacción. El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp (62,5  $\mu$ M). A,  $p < 0,01$  vs el grupo blanco; B,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con TPA.



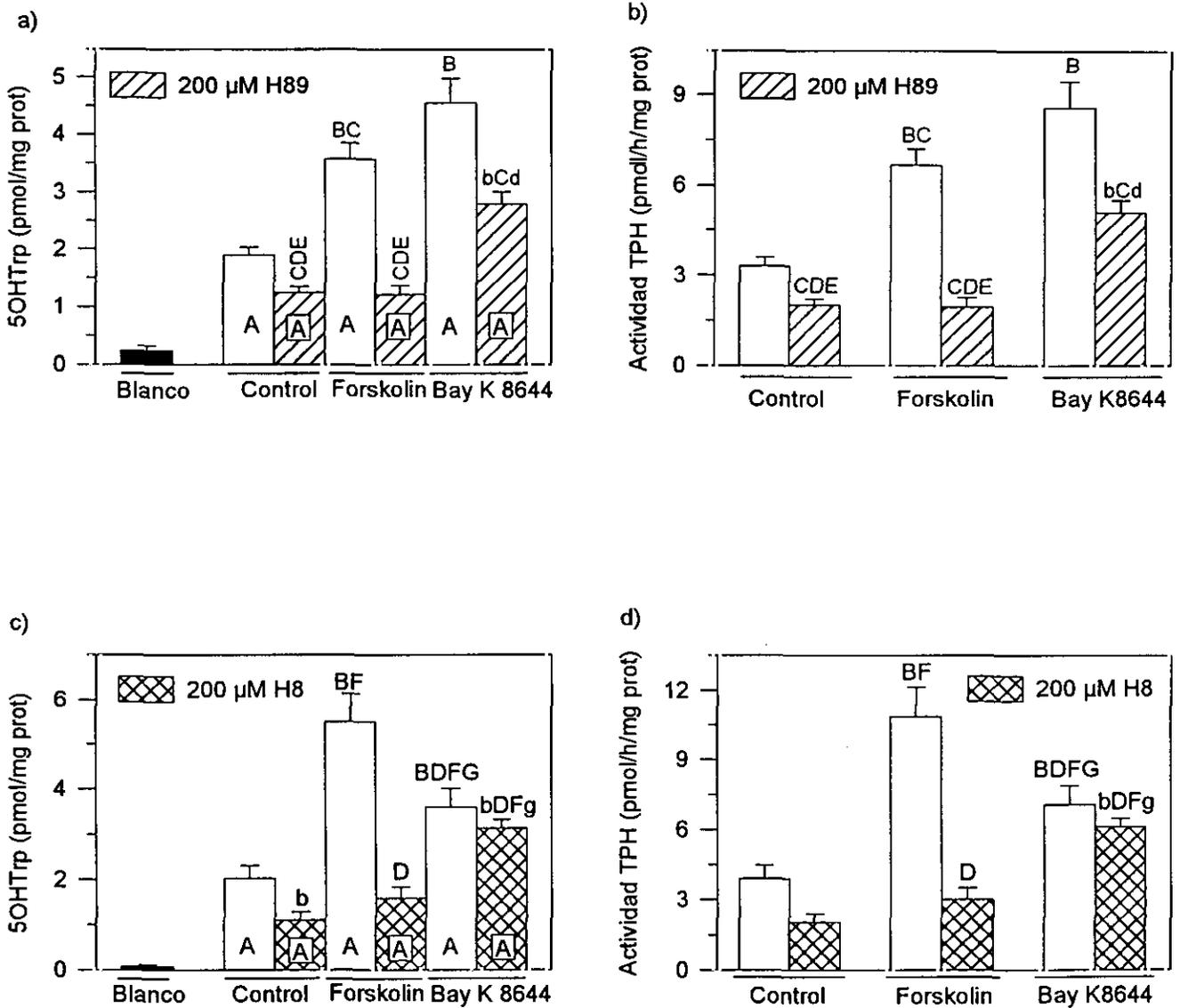
**Figura 38:** Efecto de los inhibidores de la CaMKII, KN-93 (30 μM) y KT 5926 (10 μM) y su control negativo, KN-92 (30 μM), en las retinas controles y tratadas con Bay K8644 sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10 μM) las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz o oscuridad (indicado por la barra negra). El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp (62,5 μM). A, p<0,01 vs el grupo blanco; B, p<0,01 vs el grupo tratado con Bay K 8644; C, vs el grupo tratado con Bay K8644 y KN-93; D, vs el grupo tratado con Bay K8644 y KN-92; E, vs el grupo tratado con KT 5926; F, vs el grupo cultivado en luz.

presencia del inhibidor cheleritrina. El mismo resultado se obtiene cuando se utiliza otro inhibidor específico de la PKC, calfofostina C (5  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 37c y d). Es más, en el mismo experimento el efecto estimulador del TPA también es bloqueado por el inhibidor de la PKA, H89 (200  $\mu\text{M}$ ), indicando que los efectos estimuladores de la PKC en la regulación de la actividad TPH no son directos, sino que están mediados por un aumento del contenido intracelular de cAMP y una activación de la PKA.

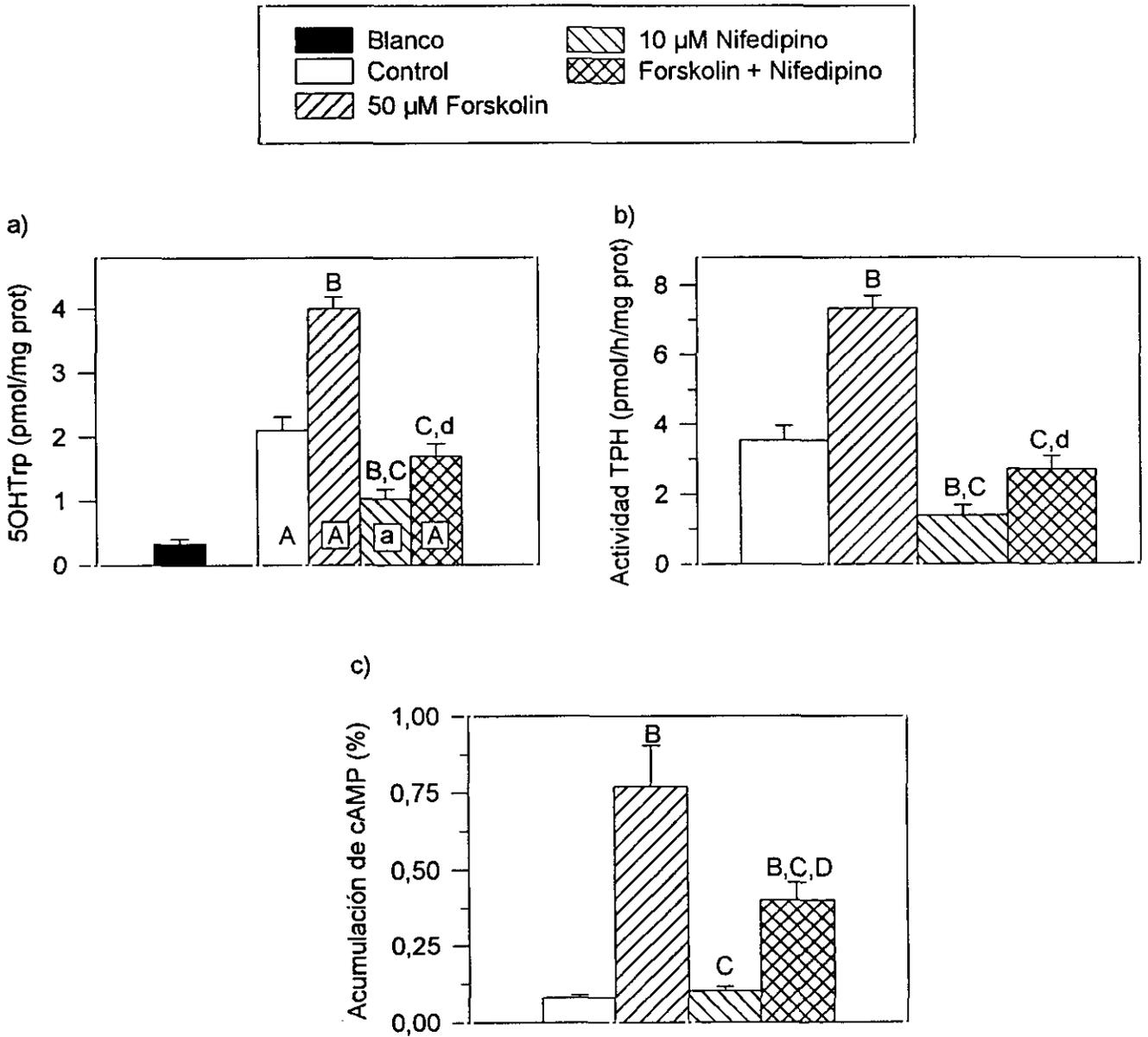
El complejo calcio-calmodulina podría regular la actividad TPH a través de la activación de distintas proteínas quinasas. En la figura 38 observamos que el efecto estimulador del Bay K8644 sobre la acumulación del 5OHTrp (Fig. 38a) y la actividad TPH (Fig. 38b) se bloqueó por el inhibidor de la proteína quinasa II dependiente del complejo calcio-calmodulina (CaMKII), KN-93 (30  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, su control negativo, KN-92 no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática ni en ausencia ni en presencia de Bay K8644. La intervención de la CaMKII en la regulación positiva de la actividad TPH se confirma con la adición de otro inhibidor de dicha proteína, KT5926 (10  $\mu\text{M}$ ). Este fármaco eliminó completamente el efecto estimulador del Bay K8644 sobre la acumulación de 5OHTrp (Fig. 38c) y la actividad TPH (Fig. 38d), tanto cuando el cultivo tuvo lugar en luz como en oscuridad. Es más, el KT5926 es capaz de bloquear el efecto estimulador de la oscuridad sobre la actividad TPH reforzando la participación de la CaMKII en la elevación fisiológica de los niveles nocturnos de actividad TPH.

Otro de los posibles efectores del complejo calcio-calmodulina en la regulación de la actividad TPH es la estimulación de la actividad adenilato ciclasa tipo I (isoenzima dependiente de calcio-calmodulina). En la figura 39, se observa que el efecto estimulador del Bay K8644 se reduce ligeramente por el inhibidor de la PKA, H89 (200  $\mu\text{M}$ ), indicando que parte de los efectos reguladores del calcio sobre la actividad TPH se ejercen a través del cAMP. En el mismo experimento, el H89 bloqueó totalmente el efecto estimulador del forskolin sobre la acumulación de 5OHTrp (Fig. 39a) y la actividad TPH (Fig. 39b), confirmando que los efectos reguladores del cAMP sobre la actividad TPH se ejercen a través de la PKA. Un resultado similar se obtuvo cuando se repitió el experimento utilizando otro inhibidor de la PKA, H8 (Fig. 39 c y d).

En la figura 40 se observa que la adición de un antagonista de los canales de calcio tipo L, nifedipino (10  $\mu\text{M}$ ), bloqueó totalmente el efecto estimulador del forskolin (activador de la AC)



**Figura 39:** Efecto del activador de la AC, forskolin (50  $\mu$ M), y de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, Bay K8644 (5  $\mu$ M), en retinas controles y tratadas con los inhibidores de la PKA, H89 (200  $\mu$ M) y H8 (200  $\mu$ M), sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu$ M) las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp fue 62,5  $\mu$ M. Las letras muestran las significaciones estadísticas indicando las minúsculas  $p < 0,05$  y las mayúsculas  $p < 0,01$ . A, vs el grupo blanco; b, vs el grupo control; C, vs el grupo tratado con Bay K8644; D, vs el grupo tratado con Forskolín; E, vs el grupo tratado con Bay K8644 y H89; F, vs el grupo tratado con H8; g, vs el grupo tratado con Forskolín y H8.



**Figura 40:** Efecto del bloqueante de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, nifedipino (10  $\mu$ M) en retinas controles y tratadas con el activador de la AC forskolin (50  $\mu$ M) sobre a) la acumulación de 5OHTrp, b) la actividad TPH y c) la acumulación de cAMP en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu$ M) las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp 62,5  $\mu$ M. Las letras muestran las significaciones estadísticas: minúsculas  $p < 0,05$ , mayúsculas  $p < 0,01$ ; a, vs el grupo blanco; B, vs el grupo control; C, vs el grupo tratado con forskolin; D, vs el grupo tratado con nifedipino.

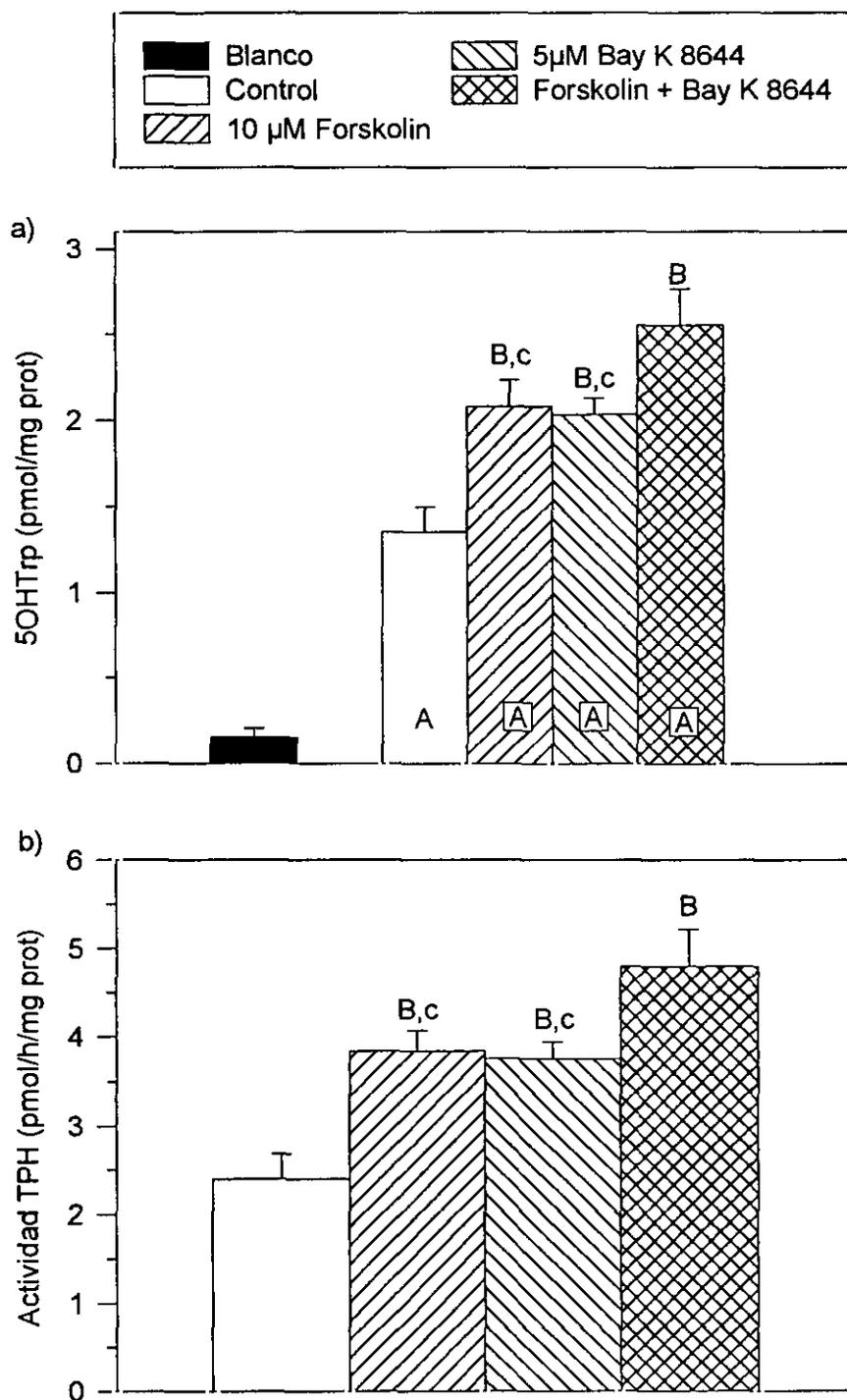
sobre la acumulación de 5OHTrp (Fig. 40a) y la actividad TPH (Fig. 40b), indicando que se requiere una elevación previa de los niveles de calcio intracelular para que pueda producirse la estimulación de la actividad TPH mediada por cAMP. La adición de nifedipino también redujo la actividad enzimática respecto al control (38% respecto al control), subrayando una vez más el importante papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulación de la TPH. La necesidad de unos niveles elevados de calcio para que pueda producirse la elevación de los niveles de cAMP queda demostrada en la figura 40c donde se observa que la estimulación de la acumulación de cAMP provocada por el forskolin se redujo drásticamente en presencia de nifedipino.

En la figura 41 se muestra que la coadministración de forskolin y Bay K8644 produjo una sobreestimulación del contenido de 5OHTrp (Fig. 41a) y la actividad TPH (Fig. 41b) respecto a la adición por separado de los mismos. Este efecto aditivo de ambos fármacos refuerza la hipótesis sugerida anteriormente de que, si bien los efectos del cAMP en la regulación de la actividad TPH son dependientes de los niveles de calcio en el fotorreceptor, el calcio ejerce parte de su acción reguladora por mecanismos independientes del cAMP.

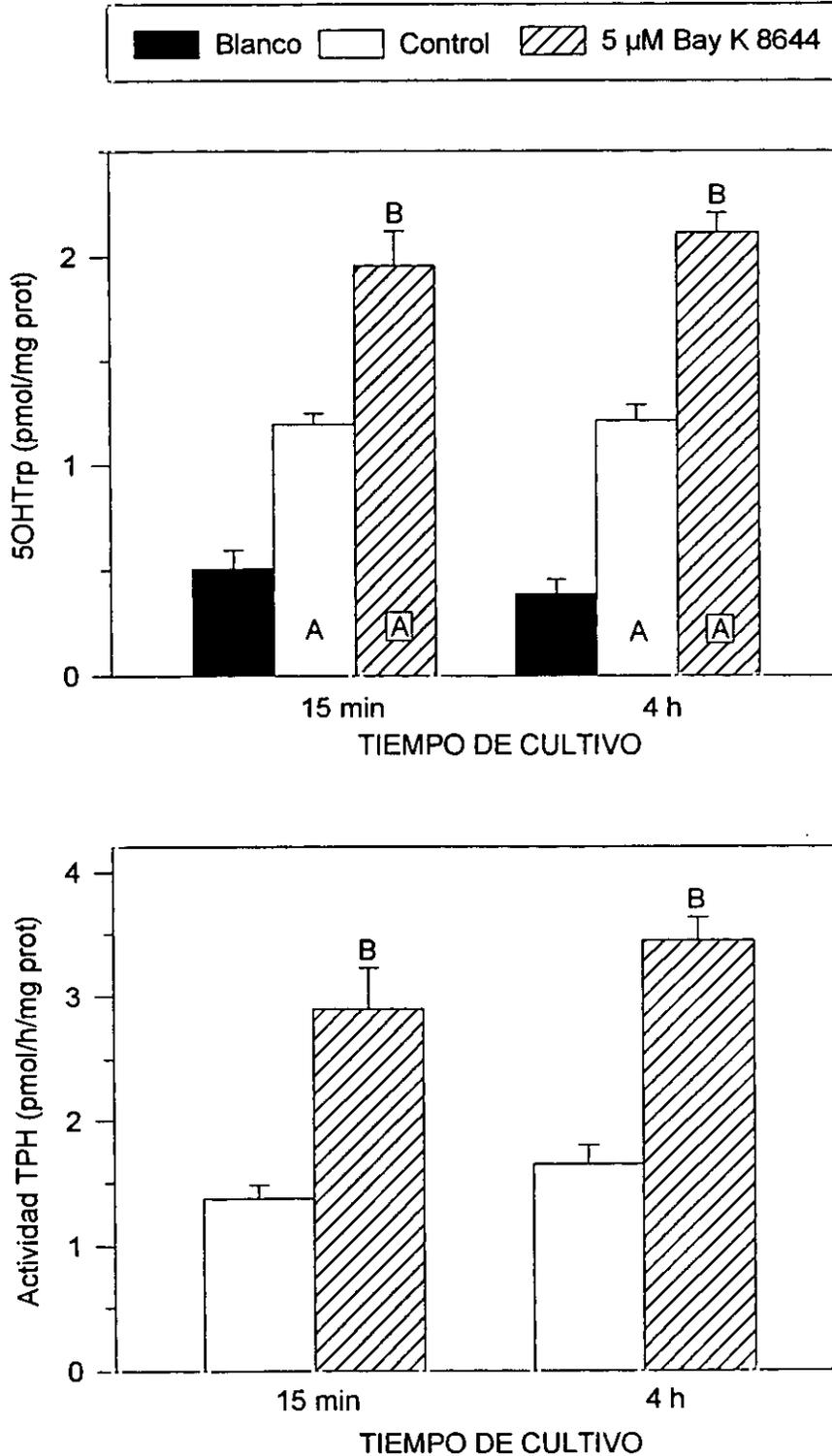
#### **d) Mecanismos de regulación implicados en el efecto del calcio sobre la actividad TPH**

En la figura 42 observamos que el efecto estimulador del Bay K8644 sobre la acumulación de 5OHTrp y la actividad TPH es el mismo para las copas ópticas cultivadas durante sólo 15 minutos o por 4 horas antes del inicio de la reacción, sugiriendo que los efectos del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la actividad TPH están mediados, al menos en parte, por mecanismos de regulación rápidos como la fosforilación.

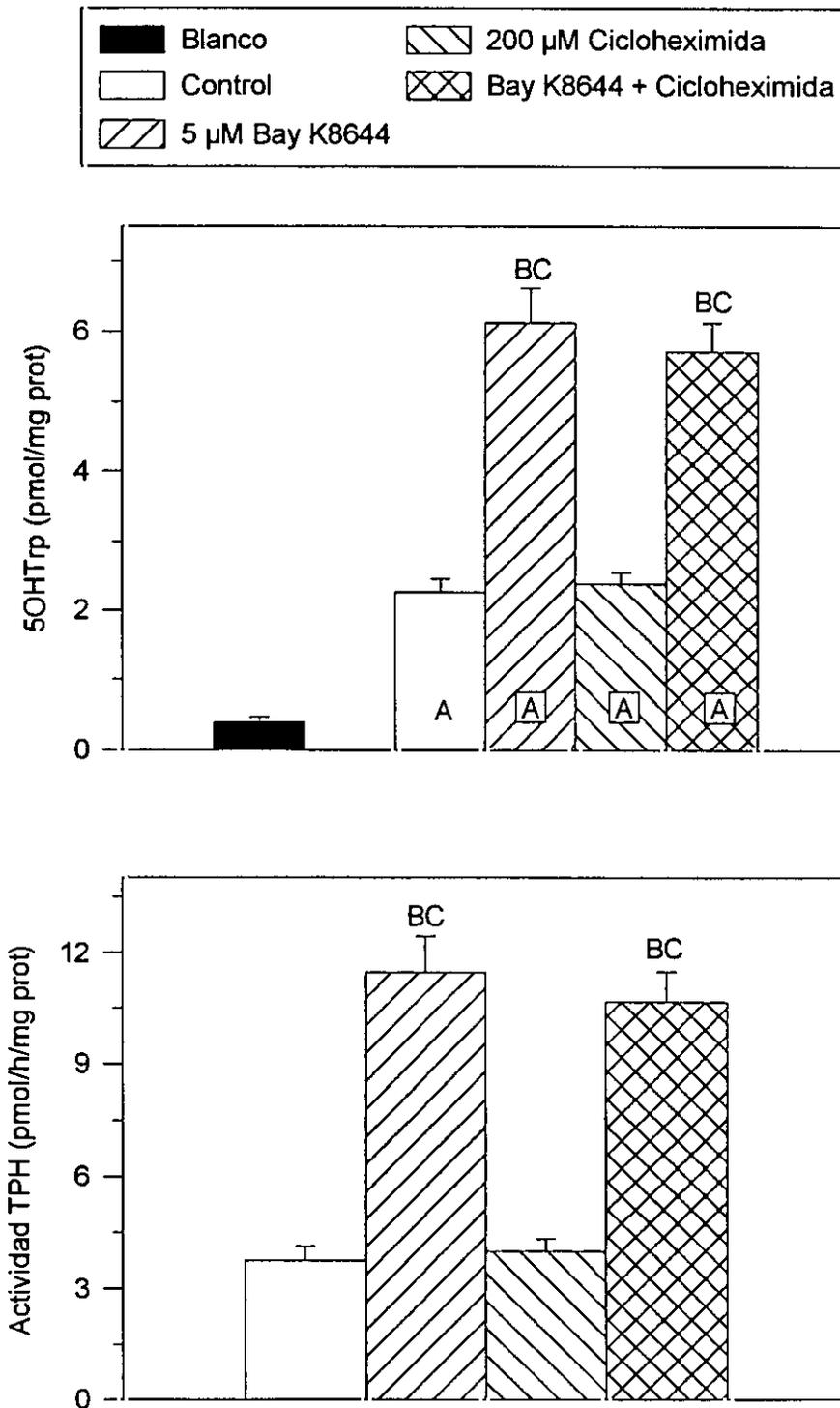
En la figura 43 observamos que cuando las copas ópticas se cultivaron durante 6 horas con Bay K8644 se produjo una estimulación de la acumulación de 5OHTrp (Fig. 43a) y de la actividad TPH (Fig. 43b) que se conserva en presencia del inhibidor de la traducción de proteínas, cicloheximida (200  $\mu\text{M}$ ). La adición del inhibidor de la transcripción génica, actinomicina D (20  $\mu\text{M}$ ) tampoco modificó el efecto estimulador del Bay K8644 sobre la acumulación de 5OHTrp (Fig. 44a y c) y la actividad TPH (Fig. 44b y d) independientemente de que el cultivo se realice durante la noche subjetiva o durante el día. Estos resultados parecen excluir que el calcio esté regulando la expresión del gen y la traducción del mRNA de la TPH.



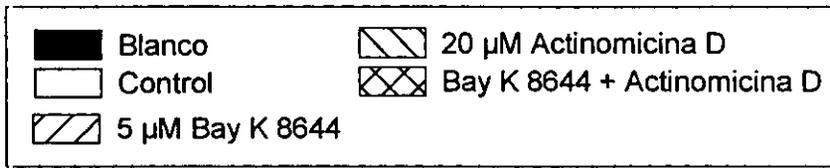
**Figura 41:** Efecto del activador de la AC, forskolin (50  $\mu$ M) en retinas controles y tratadas con el activador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, Bay K8644 (10  $\mu$ M) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu$ M), las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp 62,5  $\mu$ M. Las letras muestran las significaciones estadísticas: minúsculas  $p < 0,05$ , mayúsculas  $p < 0,01$ ; A, vs el grupo blanco; B, vs el grupo control; c, vs el grupo tratado con forskolin y Bay K8644.



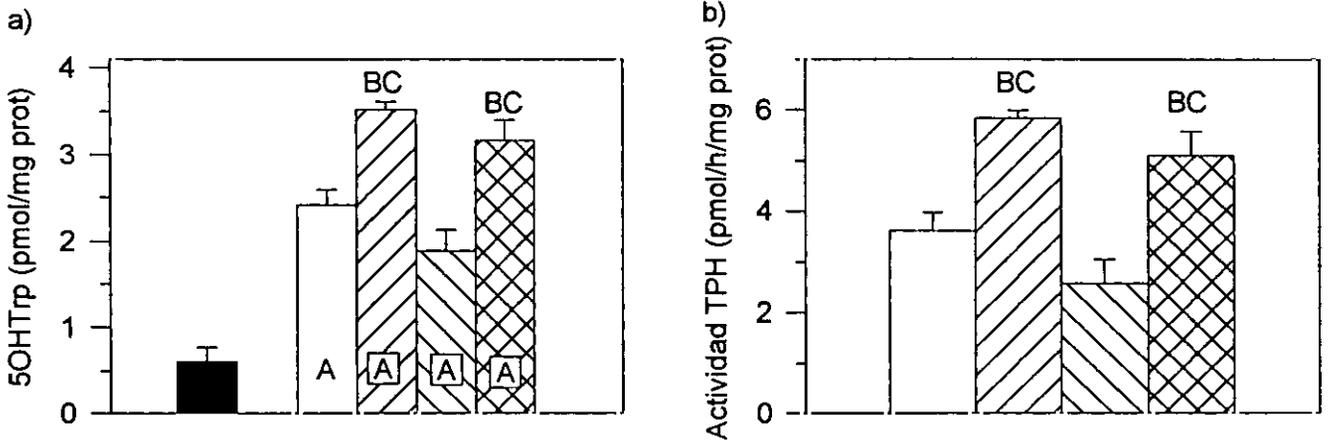
**Figura 42:** Efecto del activador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, Bay K8644 (5  $\mu$ M) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu$ M), las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 15 minutos ó 4 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp 62,5  $\mu$ M. A,  $p < 0,01$  vs el grupo blanco; B,  $p < 0,01$  vs el grupo control.



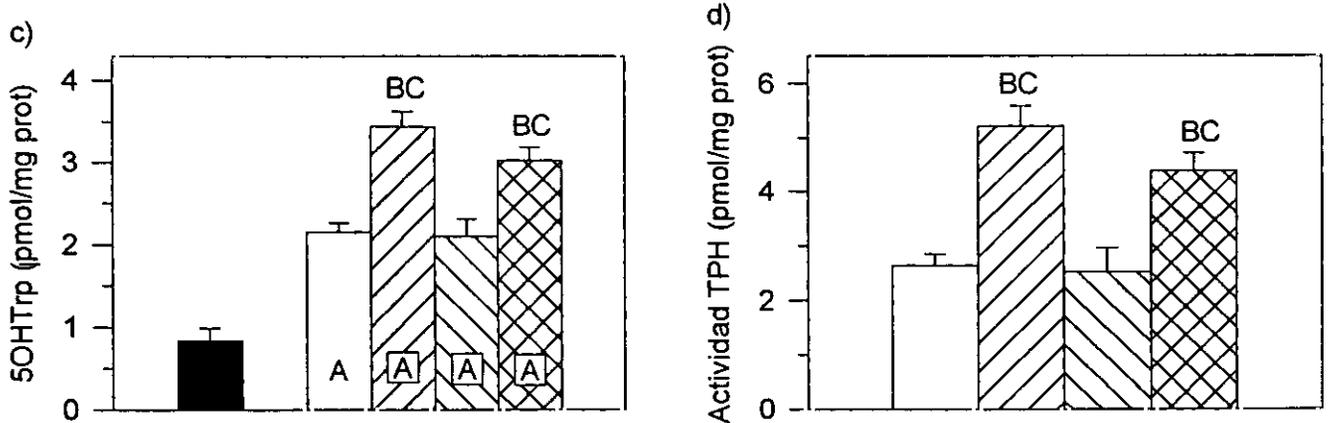
**Figura 43:** Efecto del inhibidor de la traducción, cicloheximida (200  $\mu\text{M}$ ) en retinas controles y tratadas con el activador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, Bay K8644 (5  $\mu\text{M}$ ) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu\text{M}$ ), las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 6 horas en luz (inicio del cultivo ZT12). El tiempo de reacción fue 30 minutos; concentración de L-Trp 62,5  $\mu\text{M}$ . A,  $p < 0,01$  vs el grupo blanco; B,  $p < 0,01$  vs el grupo control; C,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con cicloheximida.



RETINAS CULTIVADAS DESDE ZT12 HASTA ZT18



RETINAS CULTIVADAS DESDE ZT0 HASTA ZT6



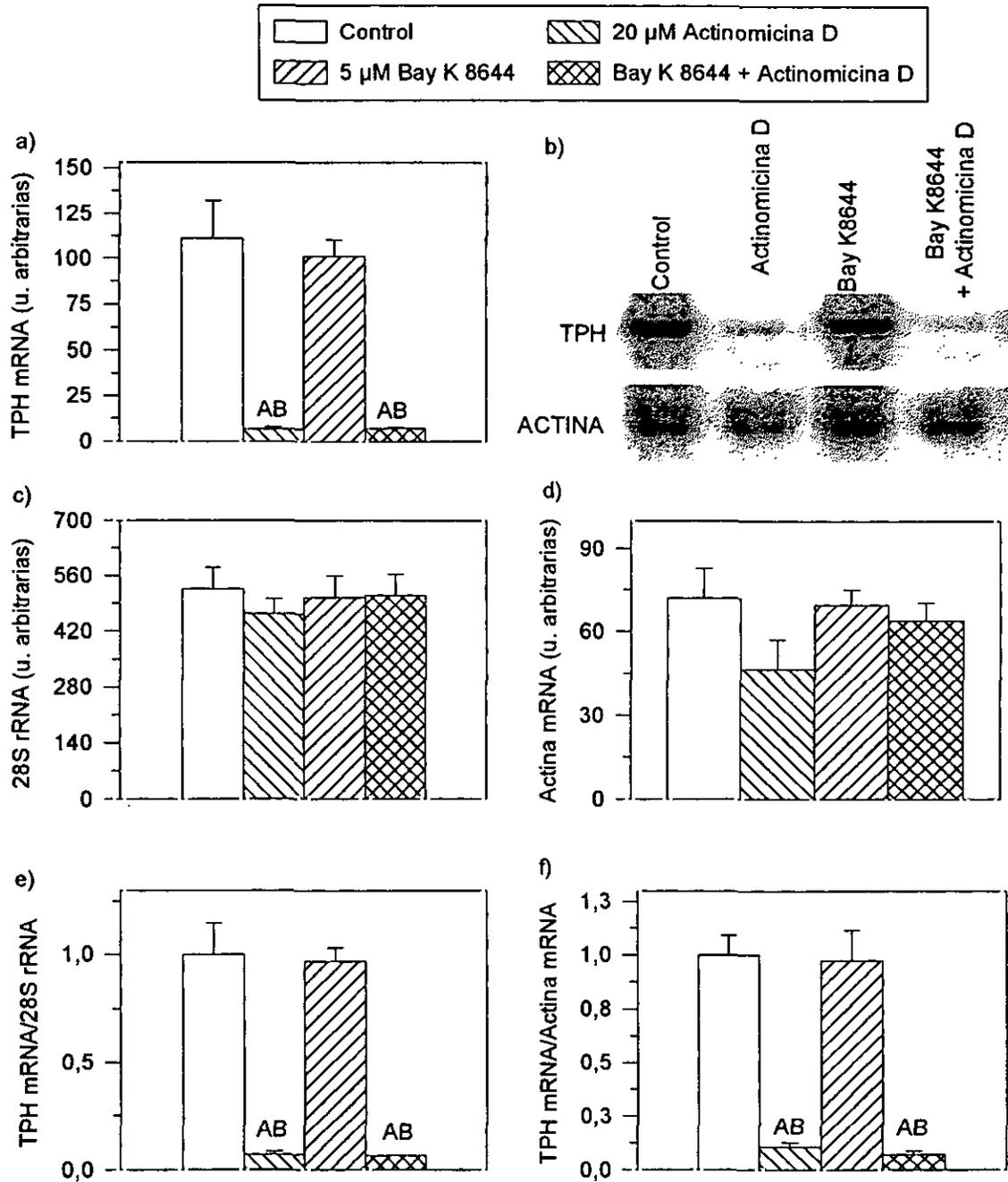
**Figura 44:** Efecto del inhibidor de la transcripción, actinomicina D (20 μM) en las retinas controles y tratadas con el activador de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L, Bay K8644 (5 μM) sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10 μM), las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 6 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp (62,5 μM). A, p<0,01 vs el grupo blanco; B, p<0,01 vs el grupo control; C, p<0,01 vs el grupo tratado con actinomicina D.

La hipótesis anterior se confirma en la figura 45. La adición de Bay K8644 no modificó el contenido retiniano de mRNA de la TPH, permitiendo descartar cualquier tipo de modulación de la expresión del gen de la TPH por calcio. Además, la adición de actinomicina D redujo el mRNA de la TPH a niveles casi indetectables y este efecto no se vió modificado por la presencia de Bay K8644, indicando que el calcio tampoco tiene ningún efecto sobre la estabilidad del mensajero de la TPH. Estos efectos fueron independientes del fotoperíodo, obteniéndose el mismo resultado cuando se cultivó durante la noche subjetiva (Fig. 45) o durante el día (Fig. 46). En ambos casos, tanto el contenido de rRNA (Fig. 45 y 46 b) como el de mRNA de la actina (Fig. 45 y 46 c) fue similar entre todos los grupos.

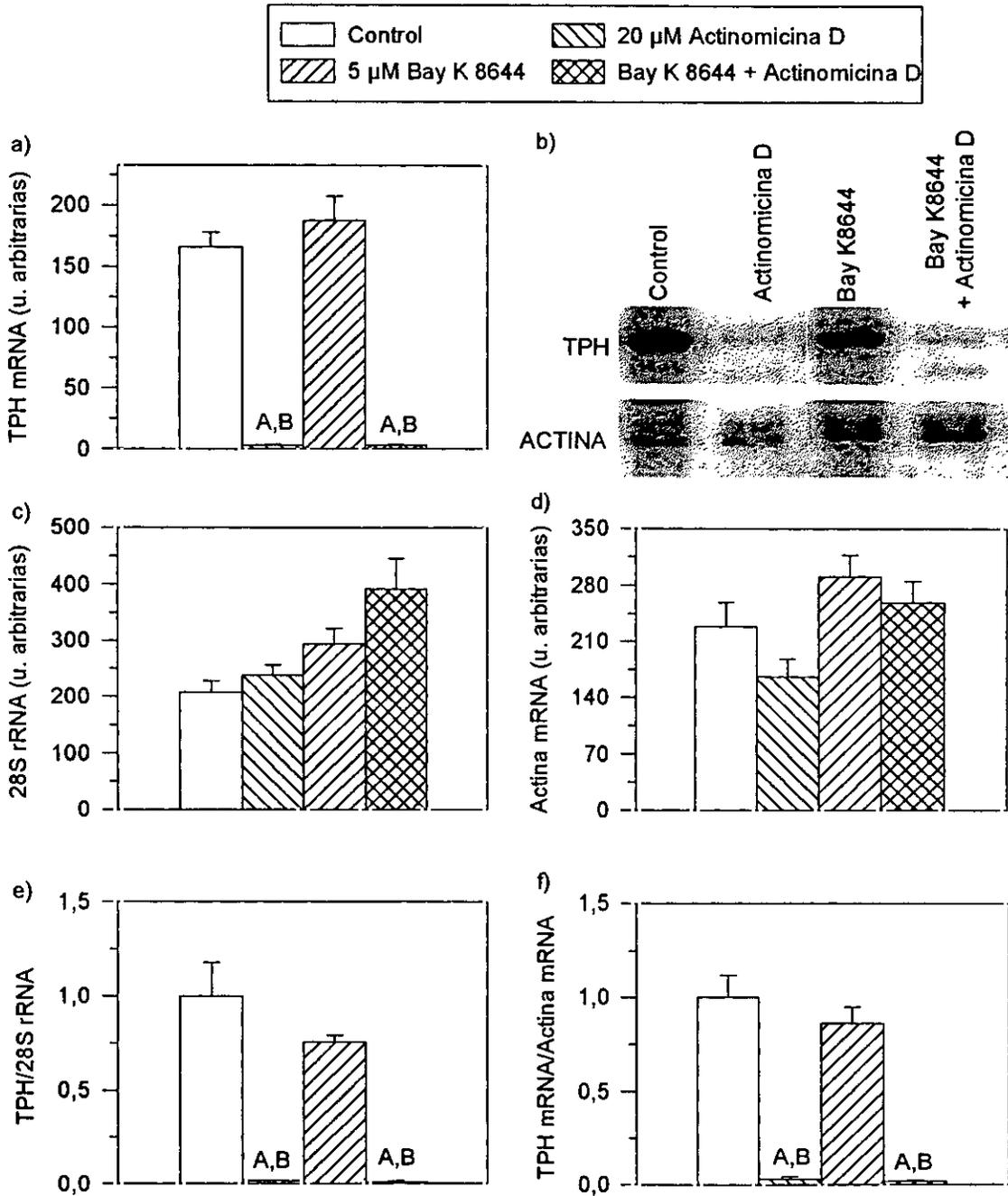
### 3.2.3. REGULACIÓN POR cGMP

Nuestro siguiente objetivo fue determinar si el cGMP también intervenía en la regulación de la actividad TPH. En la figura 47, se observa que la adición de un activador de la PKG, dibutilil-bcGMP (3 mM), no tuvo ningún efecto sobre el contenido de 5OHTrp (Fig. 47a) ni la actividad TPH (Fig. 47b) cuando el cultivo se realizó en luz, pero provocó una estimulación de ambos parámetros en oscuridad, indicando la posible participación de esta proteína quinasa en la regulación nocturna de la actividad TPH. Así mismo, el grupo control en oscuridad fue significativamente distinto al de luz.

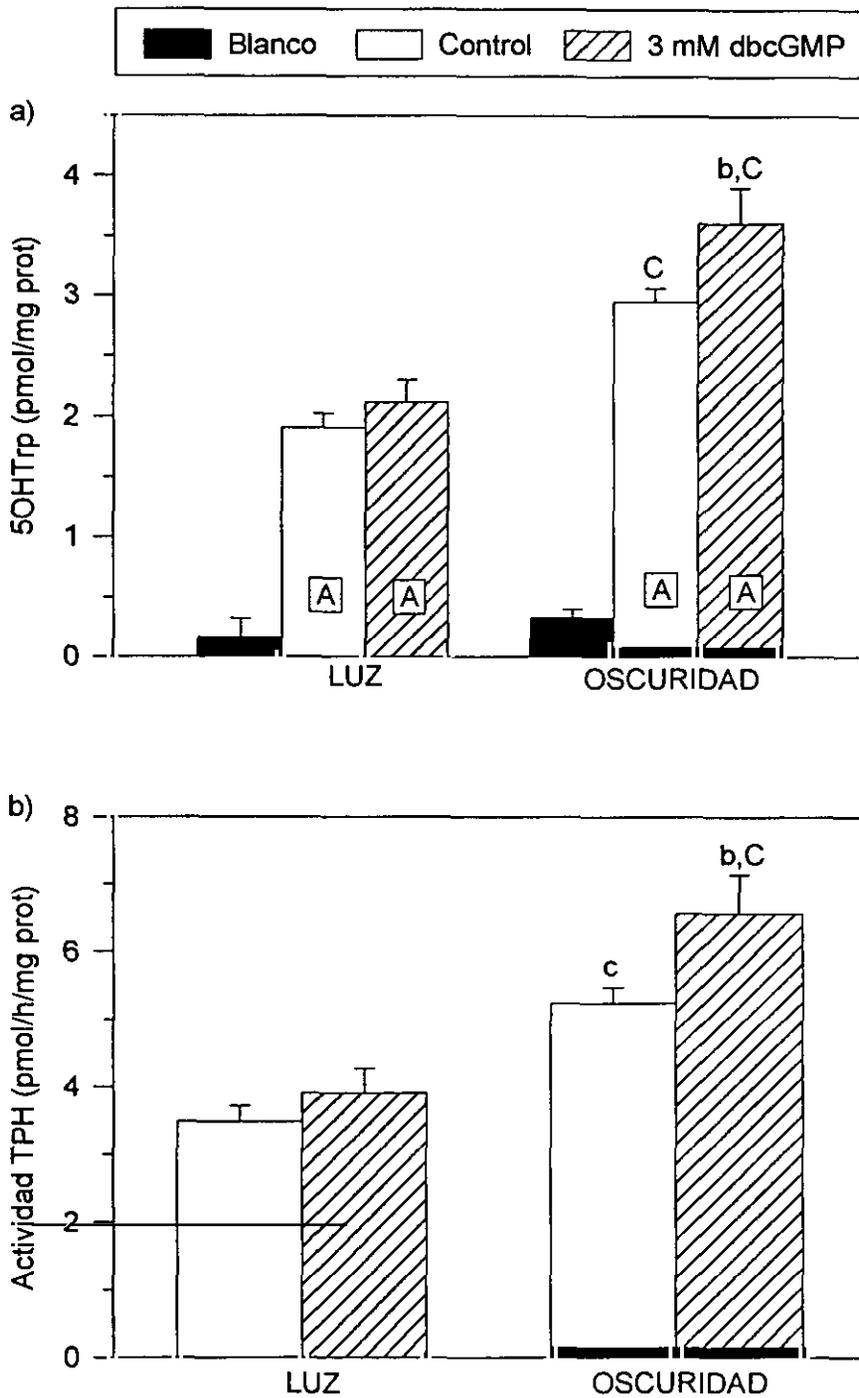
La adición de un inhibidor de las fosfodiesterasas de cGMP de tipo V, zaprinast (75  $\mu$ M) estimuló la acumulación de 5OHTrp (Fig. 48a) y la actividad TPH (Fig. 48b) tanto en luz como en oscuridad. La adición de zaprinast en luz mimetizó el efecto de la oscuridad sobre la actividad enzimática siendo el efecto del zaprinast y la oscuridad aditivos. Cuando se repitió el experimento con otro inhibidor de las fosfodiesterasa de tipo V, 4-[[3,4-(Metilendioxi)benzil]amino]-6-cloroquinazoline (MBCQ), la acumulación de 5OHTrp (Fig. 48c) y la actividad TPH (Fig. 48d) aumentaron en luz mimetizando el efecto de la oscuridad, pero no se modificaron en oscuridad. Estos resultados sugieren que las fosfodiesterasas con una farmacología similar a las de tipo V, como es el caso de la isoenzima asociada a la fotorespuesta en el fotorreceptor de los vertebrados (denominada también PDE-VI), están implicadas en la regulación de los niveles de cGMP que modulan la actividad TPH.



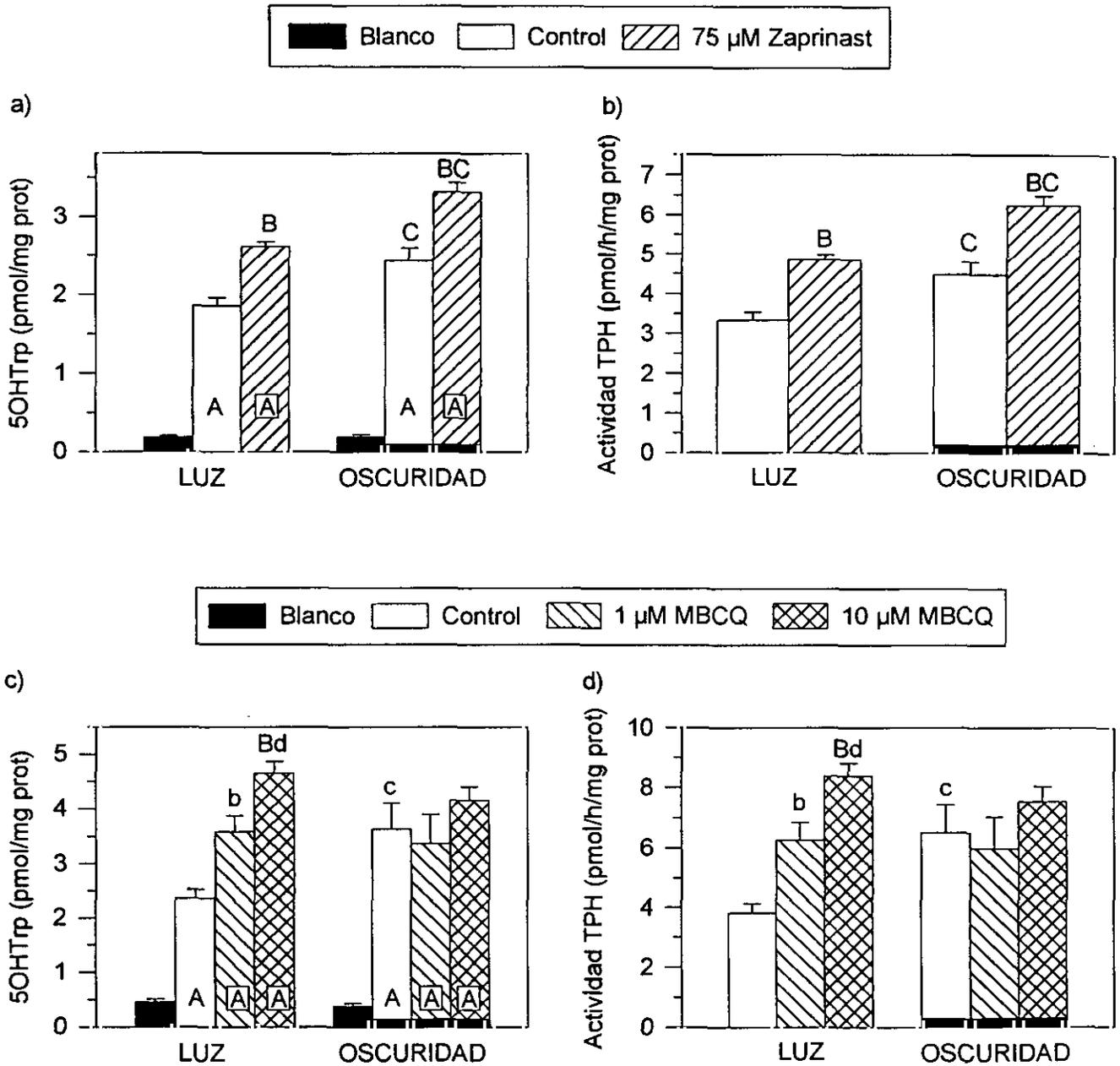
**Figura 45:** Efecto del inhibidor de la transcripción, actinomicina D (20  $\mu\text{M}$ ) en retinas controles y tratadas con el activador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, Bay K8644 (5  $\mu\text{M}$ ) sobre a) el mRNA de la TPH c) el rRNA 28S d) mRNA de la actina. Las copas ópticas se cultivaron en presencia de los fármacos durante 6 horas en luz (inicio del cultivo ZT12). En b) se muestra la hibridación de las sondas de la TPH y la actina de un dato representativo de cada grupo. En e) y f) se muestran los cocientes TPH mRNA/28S rRNA y TPH mRNA/Actina mRNA representándose la media aritmética y el error estándar de los distintos grupos normalizados respecto al grupo control. A,  $p < 0,01$  vs al grupo control; B,  $p < 0,01$  vs al grupo tratado con Bay K8644.



**Figura 46:** Efecto del inhibidor de la transcripción, actinomicina D (20  $\mu\text{M}$ ) en retinas controles y tratadas con el activador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, Bay K8644 (5  $\mu\text{M}$ ) sobre a) el mRNA de la TPH c) el rRNA 28S d) mRNA de la actina. Las copas ópticas se cultivaron en presencia de los fármacos durante 6 horas en luz (inicio del cultivo ZT0). En b) se muestra la hibridación de las sondas de la TPH y la actina de un dato representativo de cada grupo. En e) y f) se muestran los cocientes TPH mRNA/28S rRNA y TPH mRNA/Actina mRNA representándose la media aritmética y el error estándar de los distintos grupos normalizados respecto al grupo control. A,  $p < 0,01$  vs al grupo control; B,  $p < 0,01$  vs al grupo tratado con Bay K8644.



**Figura 47:** Efecto del activador de la PKG, dibutilil-cGMP (3 mM) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu$ M), las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz o en oscuridad (barra oscura en la base de la columna). El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp 62,5  $\mu$ M. Las letras muestran las significaciones estadísticas: minúsculas  $p < 0,05$ , mayúsculas  $p < 0,01$ ; A, vs el grupo blanco; b, vs el grupo control; C, vs las retinas cultivadas en luz.



**Figura 48:** Efecto de los inhibidores de la PDE tipo V, zaprinast (75  $\mu$ M) y MBCQ (1 y 10  $\mu$ M) sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH, en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu$ M) las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz o en oscuridad (barras oscuras). El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp 62,5  $\mu$ M. A,  $p < 0,01$  vs el grupo blanco; B,  $p < 0,01$  vs el grupo control; C,  $p < 0,01$  vs las retinas cultivadas en luz; d, vs el grupo tratado con MBCQ (1  $\mu$ M).

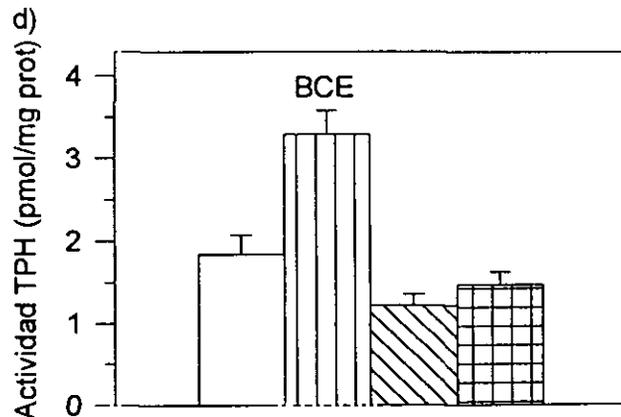
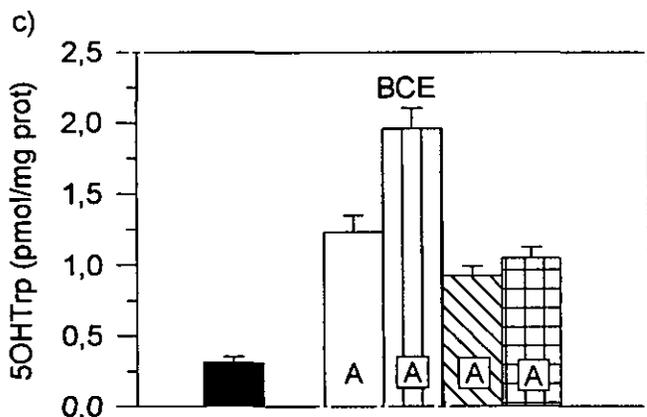
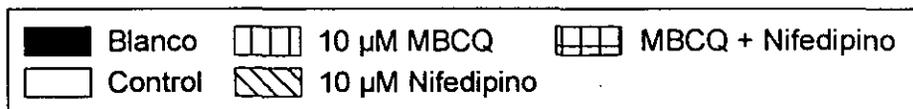
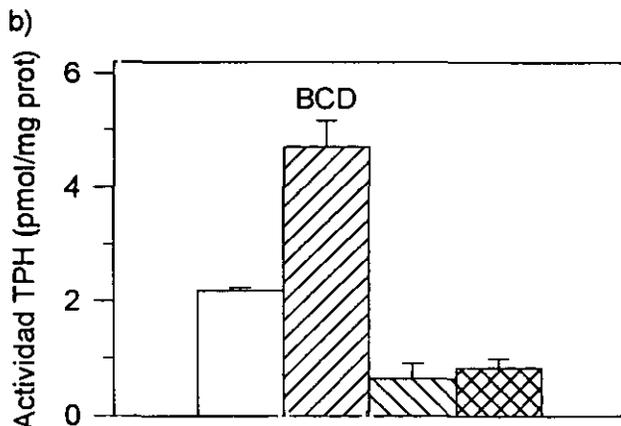
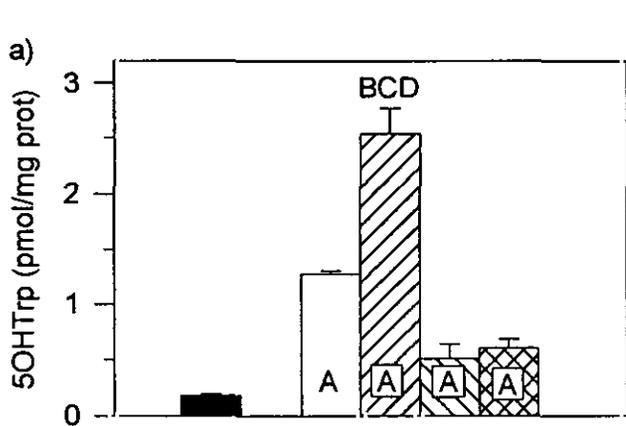
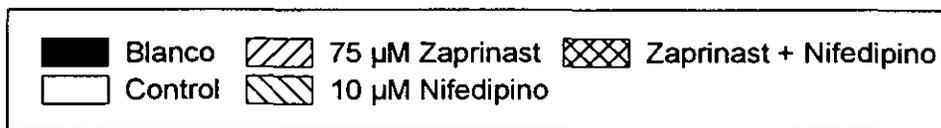
En la figura 49 se muestra que el efecto estimulador del zaprinast (75  $\mu\text{M}$ ) en luz sobre la acumulación de 5OHTrp (Fig. 49a) y la actividad TPH (Fig. 49b) fue bloqueado por el antagonista de los canales de calcio tipo L, nifedipino (10  $\mu\text{M}$ ). El mismo resultado se obtuvo cuando se utilizó otro inhibidor de las PDE de tipo V, MBCQ (Fig. 49c y d). Estos resultados indican que el efecto del cGMP sobre la actividad TPH no es directo, sino que un aumento del contenido de cGMP del fotorreceptor es capaz de abrir los canales de calcio tipo L y, por tanto, despolarizar el fotorreceptor, desencadenando la secuencia de hechos que conlleva al aumento de la actividad TPH por calcio.

### **3.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA POR NEUROMODULADORES RETINIANOS**

#### **3.3.1. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH POR DOPAMINA**

En la retina de todas las especies de vertebrados estudiadas hasta la fecha, la dopamina y la melatonina desarrollan funciones antagónicas existiendo una regulación recíproca de su síntesis entre ambos neuromoduladores. El papel inhibitorio de la dopamina sobre la síntesis de melatonina y la actividad NAT está ampliamente demostrado. Por tanto, el objetivo de este apartado es estudiar el papel de la dopamina en la regulación de la actividad TPH.

En todos los experimentos de este apartado se utilizó un cultivo de copas ópticas lesionadas con KA. Si no se indica lo contrario, el tiempo de cultivo fue de 4 horas y tuvo lugar en oscuridad, durante la noche subjetiva del animal (ZT12→ZT16). Como parámetros de control de la lesión ocular se valoró el contenido de dopamina y serotonina. Cuando una retina lesionada con KA mostró niveles elevados de ambos parámetros y superiores a los criterios fijados en el apartado 2.4 de materiales y métodos (percentiles al 95% de ambos neuromoduladores), se consideró como una lesión ocular incompleta no utilizándose ni los niveles de 5OHTrp ni de la actividad TPH de la misma para el análisis estadístico. En la mayoría de los casos no se encontraron diferencias en el contenido de estos parámetros entre los distintos grupos experimentales de cada experimento.



**Figura 49:** Efecto del bloqueante de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, nifedipino (10 µM) en retinas tratadas con los inhibidores de PDE tipo V, zaprinast (75 µM) y MBCQ (10 µM), sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10 µM) las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos; concentración de L-Trp fue 62,5 µM. A,  $p < 0,01$  vs el grupo blanco; B,  $p < 0,01$  vs el grupo control; C,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con nifedipino; D,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con zaprinast y nifedipino; E, vs el grupo tratado con MBCQ y nifedipino.

**a) Tipos de receptores de dopamina implicados en la regulación de la actividad TPH**

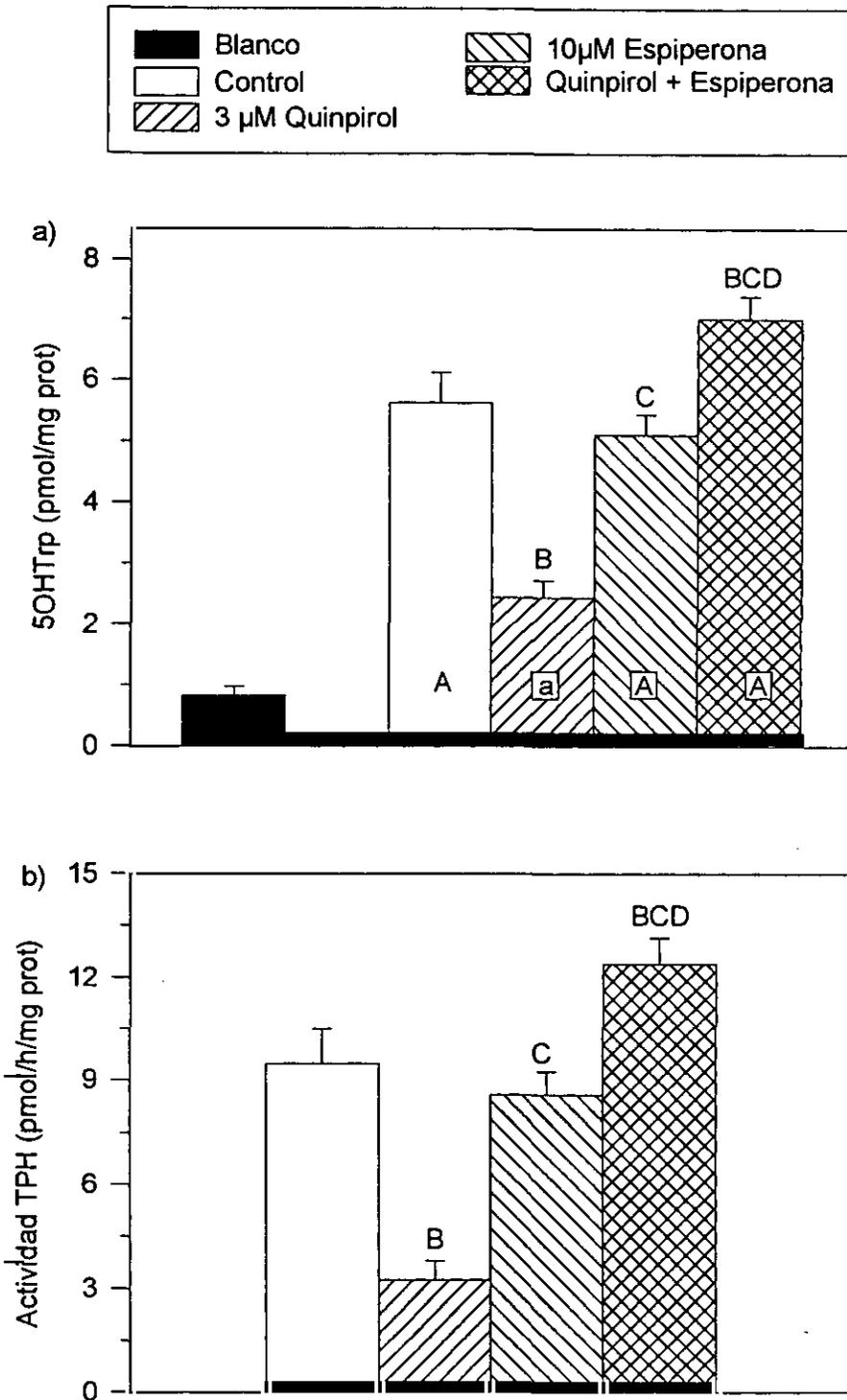
En la figura 50 se observa que tras 4 horas de cultivo en oscuridad, el grupo tratado con 3  $\mu\text{M}$  de quimpirol (agonista  $D_2$ ) redujo de su contenido de 5OHTrp y su actividad TPH hasta el 33% respecto del grupo control, indicando que la dopamina ejerce un papel inhibitorio sobre la actividad TPH. Dicho efecto fue bloqueado por la adición de 10  $\mu\text{M}$  de espiperona (antagonista  $D_2$ ) demostrando la especificidad del mismo a través de receptores de la familia  $D_2$ .

Así mismo, se comprobó si los receptores  $D_1$  también estaban implicados en la regulación de la actividad TPH por la dopamina. En la figura 51, se observa que ni la adición del agonista, SKF 38393 (10  $\mu\text{M}$ ), ni la del antagonista  $D_1$ , SCH 23390 (10  $\mu\text{M}$ ), provocaron ningún efecto sobre la acumulación de 5OHTrp ni la actividad TPH en las retinas lesionadas con KA. Sin embargo, en las retinas intactas, el SKF 38393 produjo una reducción de la actividad enzimática, quedándose en un 44% respecto al control. Dicho efecto fue bloqueado por la adición del antagonista. Este resultado confirma que los efectos de la dopamina sobre la actividad TPH de los fotorreceptores se ejercen exclusivamente a través de receptores  $D_2$ , mientras que la actividad enzimática de las neuronas está bajo el control de receptores  $D_1$ .

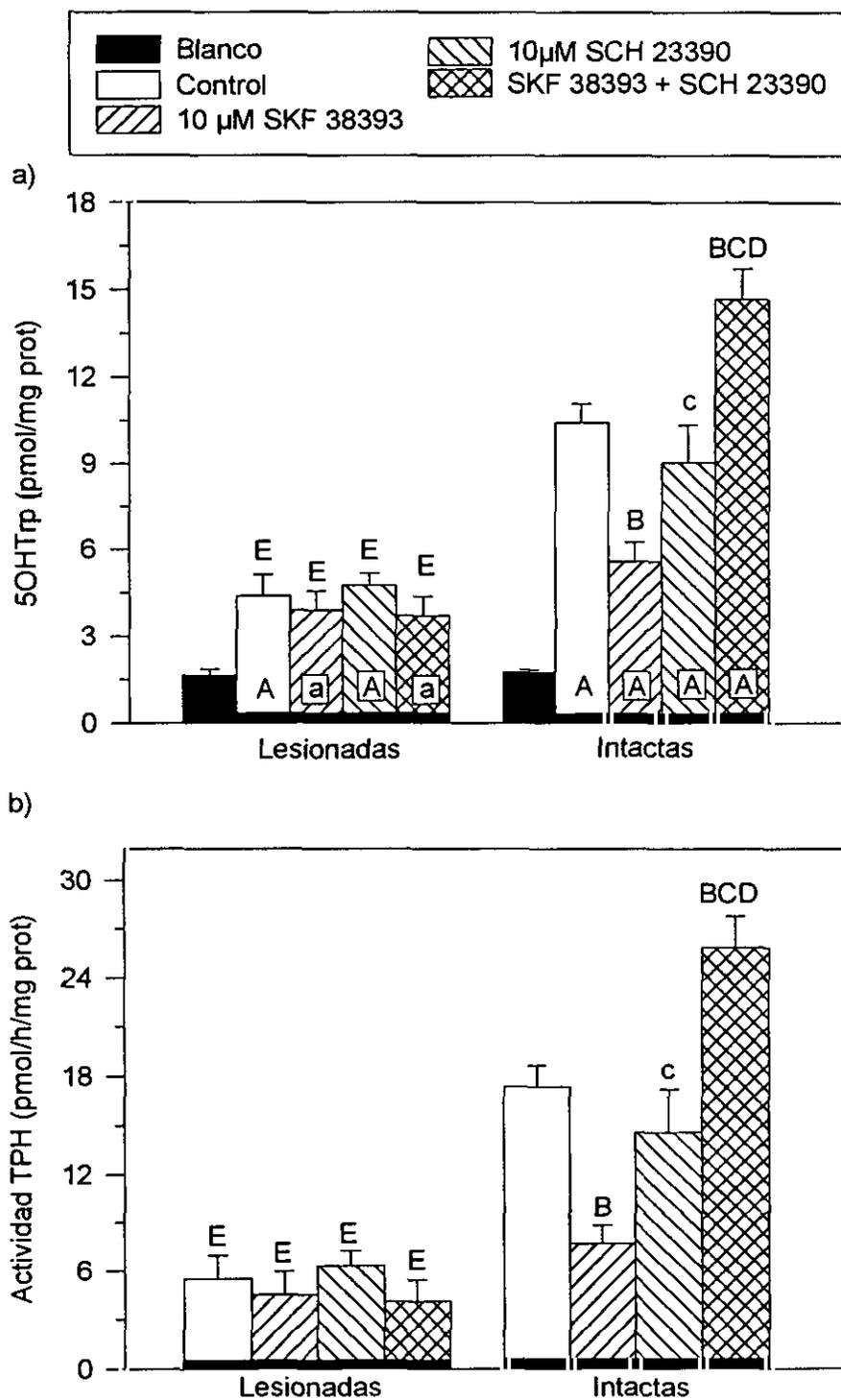
**b) Segundos mensajeros implicados en la transmisión de la señal**

Una vez demostrado el papel inhibitorio de la dopamina sobre la actividad TPH a través de receptores  $D_2$ , nuestro siguiente objetivo fue determinar los sistemas de segundos mensajeros implicados en la transmisión de la señal. En la figura 52, se observa que la adición de 3  $\mu\text{M}$  de quimpirol bloqueó totalmente, tanto el efecto estimulador del forskolin como del Bay K8644, sobre la acumulación de 5OHTrp y la actividad enzimática, indicando que el cAMP y el  $\text{Ca}^{2+}$  están implicados en la transmisión de la señal inhibitoria de la dopamina.

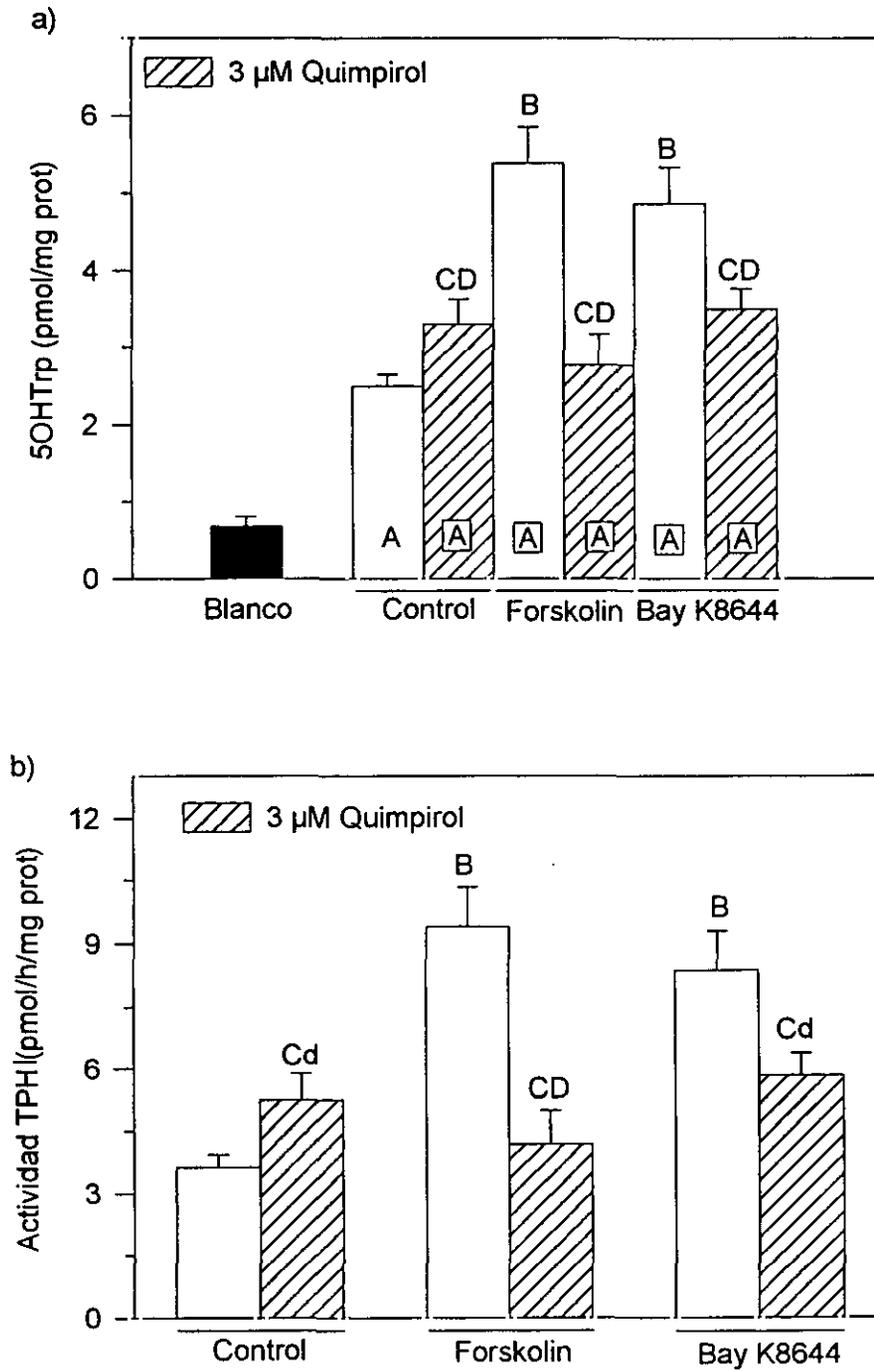
En la figura 53, se observa que la estimulación de la entrada de calcio provocada por la apertura de los canales tipo L con Bay K8644 (5  $\mu\text{M}$ ) o al despolarizar el fotorreceptor con 35 mM de KCl, se bloqueó en presencia del antagonista  $D_2$ , quimpirol (3  $\mu\text{M}$ ), sugiriendo que la dopamina es capaz de cerrar los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulando, por tanto, negativamente la actividad TPH. Así mismo, la disminución del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provocada al cerrarse los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , podría inducir una disminución en la acumulación de cAMP al inactivarse la adenilato ciclasa tipo I. Para comprobar esta hipótesis, las copas ópticas lesionadas con KA se



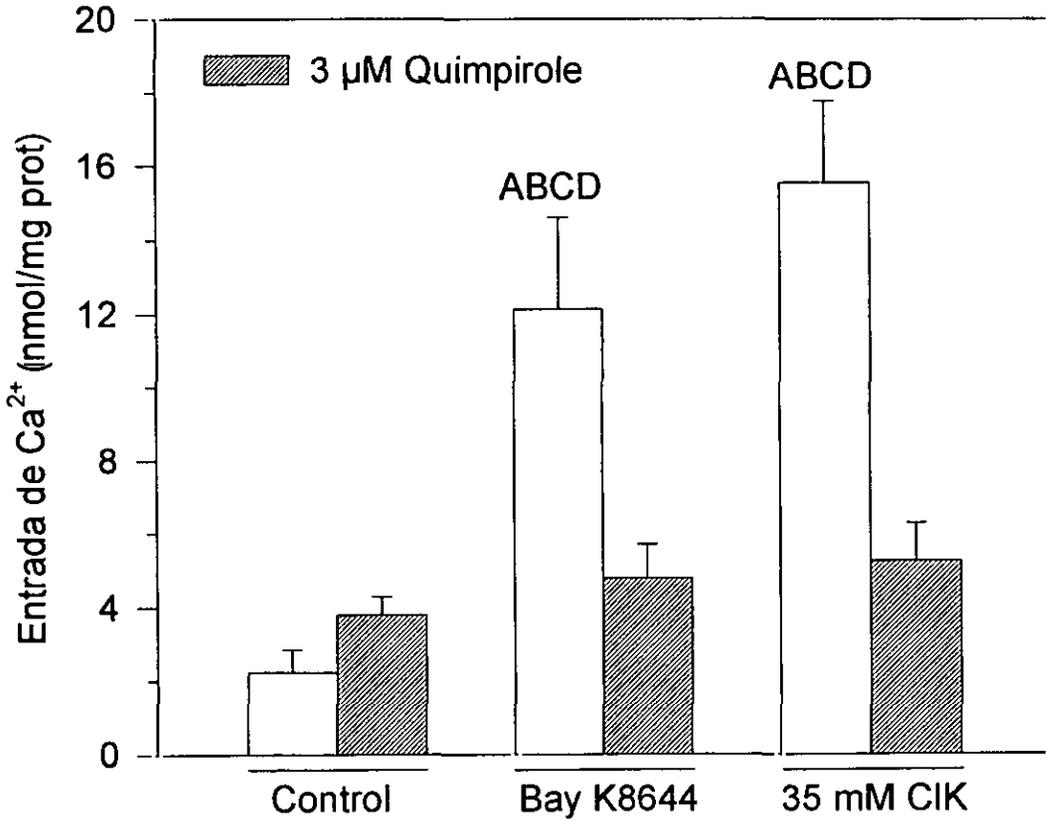
**Figura 50:** Efecto del agonista  $D_2$ , quinpirol (3  $\mu$ M) y del antagonista  $D_2$ , espiperona (10  $\mu$ M) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu$ M), las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en oscuridad. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, la concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción de 62,5  $\mu$ M. Las letras muestran las significaciones estadísticas: minúsculas,  $p < 0,05$ ; mayúsculas,  $p < 0,01$ ; a, vs el grupo blanco; B, vs el grupo control; C, vs el grupo tratado con quinpirol; D, vs el grupo tratado con espiperona.



**Figura 51:** Efecto del agonista  $D_1$ , SKF 38393 (10 μM) y el antagonista  $D_1$ , SCH 23390 (10 μM) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas intactas y lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10 μM), las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en oscuridad. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, la concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción fue 62,5 μM. Las letras muestran las significaciones estadísticas: minúsculas  $p < 0,05$ ; mayúsculas  $p < 0,01$ ; A, vs el grupo blanco; B, vs el grupo control; c, vs el grupo tratado con SKF 38393; D, vs el grupo tratado con SCH 23390 E, vs las retinas intactas.



**Figura 52:** Efecto de los activadores de la AC, forskolin (50 μM), y de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L, Bay K8644 (5 μM), sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH de retinas lesionadas de *Xenopus laevis* tratadas con quimpirol (3 μM). Previamente a la adición del mHBH (10 μM), las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, la concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción fue 62,5 μM. A, p<0,01 vs el grupo blanco; B, p<0,01 vs el grupo control; C, p<0,01 vs el grupo tratado con forskolin; D, p<0,01 vs el grupo tratado con Bay K 8644.



**Figura 53:** Efecto del activador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, Bay K8644 ( $5 \mu\text{M}$ ), y la adición de KCl ( $35 \text{ mM}$ ) sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en retinas lesionadas de *Xenopus laevis* tratadas con el agonista  $\text{D}_2$ , quimpirol ( $3 \mu\text{M}$ ). A,  $p < 0,01$  vs control; B,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con quimpirol; C,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con quimpirol y Bay K8644; D,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con quimpirol y KCl ( $35 \text{ mM}$ ).

cultivaron con forskolin (50  $\mu\text{M}$ ) en ausencia y presencia de quimpirol y nifedipino. Tanto la adición de quimpirol como la de nifedipino produjo una disminución del 50% del efecto estimulador del forskolin sobre la acumulación de cAMP (fig. 54), sugiriendo que ambos fármacos están influyendo sobre vías de transmisión que comparten pasos comunes.

### 3.3.2. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA POR ADENOSINA.

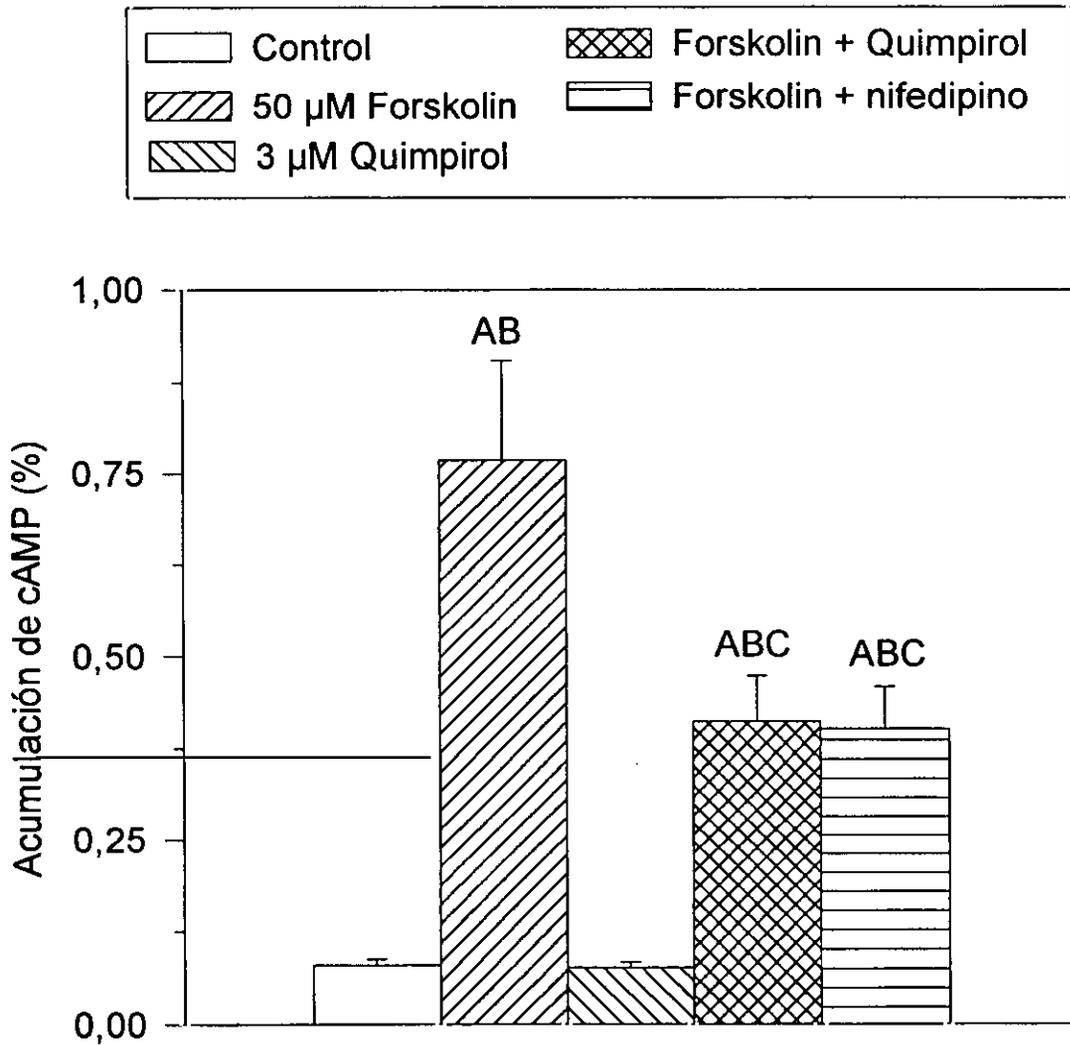
Nuestro siguiente objetivo fue determinar si la adenosina intervenía en la regulación de la síntesis de melatonina. Para ello, copas ópticas procedentes de retinas de *Xenopus laevis* lesionadas con KA se cultivaron en presencia de determinados fármacos que actúan en el sistema adenosinérgico durante 4 (actividad TPH) ó 6 (actividad NAT) horas.

Como parámetros de control de la lesión ocular se valoró el contenido retiniano de dopamina y serotonina. Cuando una retina lesionada con KA mostró niveles elevados de ambos parámetros y superiores a los criterios fijados en el apartado 2.4 de los materiales y métodos (percentiles al 95% de ambos neuromoduladores), se consideró como una lesión ocular incompleta no utilizándose ni los niveles del contenido de 5OHTrp ni de la actividad TPH de la misma para el análisis estadístico. En la mayoría de los casos no se encontraron diferencias en el contenido de estos parámetros entre los distintos grupos experimentales de cada experimento.

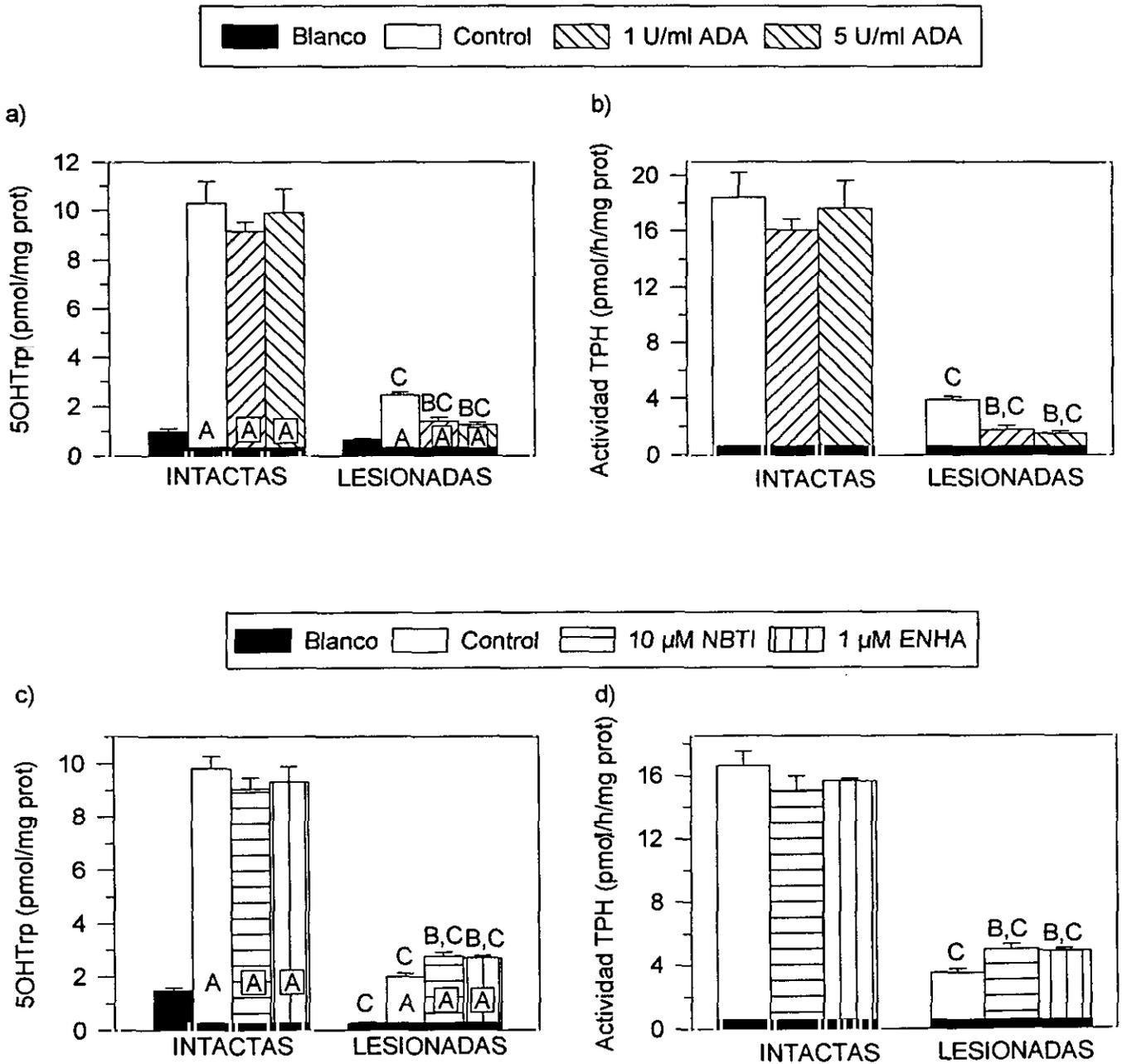
#### a) Control adenosinérgico de la síntesis de melatonina

En la figura 55 observamos que en un cultivo en oscuridad, la adición de distintas concentraciones de adenosina desaminasa (ADA), enzima encargada de la degradación de la adenosina endógena, produjo una reducción de la acumulación de 5OHTrp (Fig. 55a) y la actividad TPH (Fig. 55b) de un 60% únicamente en la retinas lesionadas con KA, no mostrando ningún efecto en las retinas intactas.

El papel de la adenosina como estimulador de la actividad TPH localizada exclusivamente en fotorreceptores, se confirmó con tratamientos farmacológicos que incrementan la concentración de adenosina endógena, como son el bloqueo de la recaptura de adenosina con S-(4-Nitrobencil)-6-tioinosina (NBTI) o la inhibición de la degradación de este neurotransmisor con ENHA, un inhibidor de la ADA endógena. En la figura 55c y d se muestra que la adición de NBTI (10  $\mu\text{M}$ ) y ENHA (1  $\mu\text{M}$ ) en oscuridad produjo una estimulación similar de la actividad



**Figura 54:** Efecto del agonista  $D_2$ , quimpirol (3  $\mu\text{M}$ ) y del antagonista de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, nifedipino (10  $\mu\text{M}$ ) sobre la acumulación de cAMP en las retinas lesionadas de *Xenopus laevis* tratadas con el activador de la AC, forskolin (50  $\mu\text{M}$ ). Previamente al comienzo de la reacción, las copas ópticas fueron premarcadas durante 4 horas, cultivándose en SC suplementada con 4  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]adenina en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos durante los que se añadieron los distintos fármacos. A,  $p < 0,01$  vs el grupo control; B,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con quimpirol, C,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con forskolin.



**Figura 55:** Efecto de la adición de adenosina desaminasa (ADA) exógena, el inhibidor de la recaptura de adenosina, NBTI (10 μM) y el inhibidor de la ADA, ENHA (1 μM) sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas intactas y lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10 μM), las copas ópticas fueron cultivadas en SC durante 4 horas en oscuridad. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, la concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción fue 62,5 μM. A, p<0,01 vs el grupo blanco; B, p<0,01 vs el grupo control; C, p<0,01 vs retinas intactas.

TPH en las retinas lesionadas con KA. De nuevo, estos fármacos no tuvieron ningún efecto en las retinas intactas.

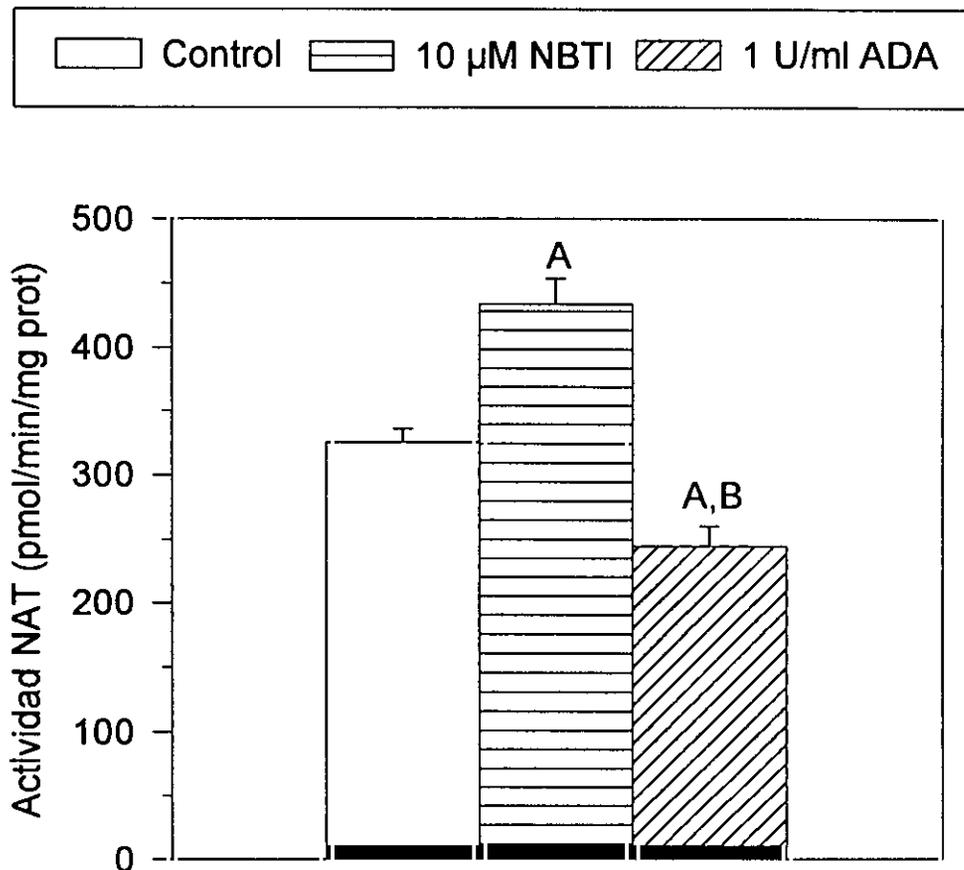
La adenosina también parece intervenir en la regulación de la actividad NAT. En la figura 56 se muestra que, en las retinas lesionadas con KA, un aumento de la concentración de la adenosina endógena extracelular al inhibir su recaptura con NBTI, estimuló la actividad NAT. Así mismo, la adición de ADA exógena induce una degradación de la adenosina endógena disminuyendo sus niveles y, por tanto, provocando una reducción de la actividad NAT respecto al control en oscuridad.

Estos resultados sugieren claramente que la adenosina está modulando la síntesis de melatonina en el fotorreceptor pero no parece influir en la síntesis de serotonina en las neuronas amacrinas.

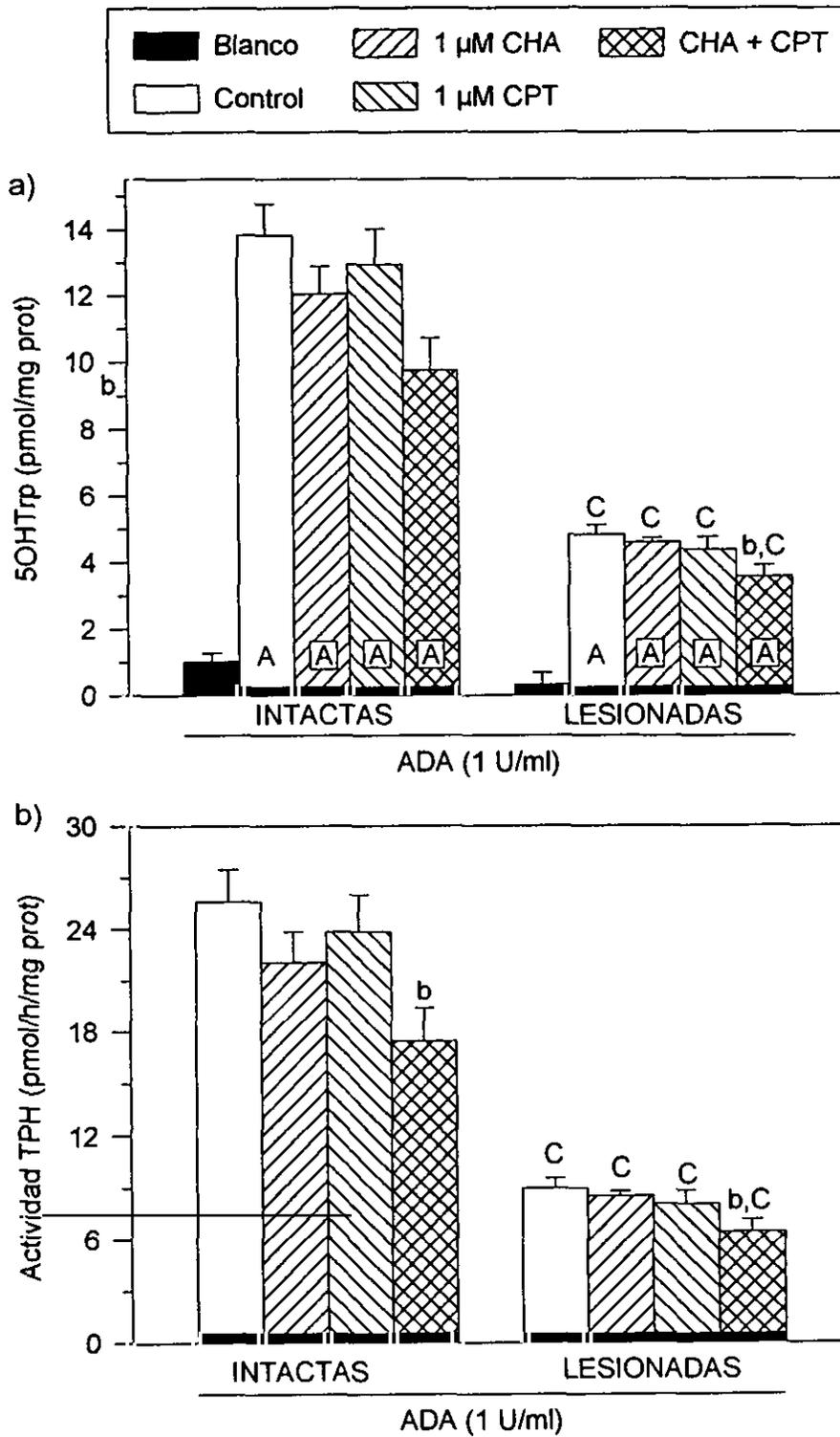
#### **b) Tipo de receptores de adenosina implicados en la regulación de la síntesis de melatonina.**

Debido a que los niveles endógenos de adenosina pueden llegar a ser suficientemente elevados para modificar las actividades TPH y NAT, para el estudio del tipo de receptores implicados en la regulación de ambas actividades enzimáticas, se añadió siempre al cultivo ADA para eliminar la adenosina endógena del tejido. El cultivo de copas ópticas en oscuridad con un agonista, CHA (1  $\mu$ M), y un antagonista, CPA (1  $\mu$ M), de los receptores  $A_1$  no produjo ningún efecto sobre la acumulación de 5OHTrp (Fig. 57a) ni la actividad TPH (Fig. 57b) de retinas lesionadas con KA o intactas. El agonista  $A_1$ , CHA, tampoco modificó la actividad NAT de copas ópticas lesionadas con KA cuando el cultivo se realizó en luz o en oscuridad (Fig. 58). Por tanto, la falta de efecto de los agonistas y antagonistas  $A_1$  sobre las actividades TPH y NAT de retinas lesionadas con KA nos permite concluir que ninguno de los efectos de la adenosina sobre la síntesis de melatonina está mediado a través de receptores  $A_1$ .

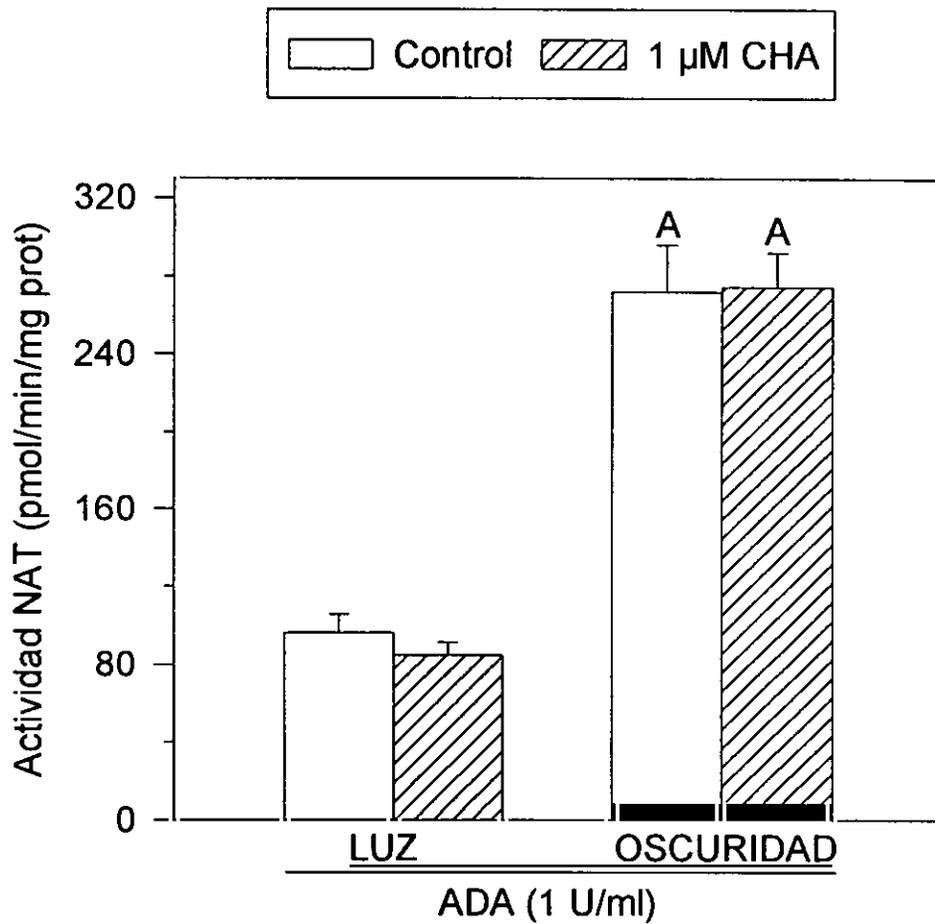
La adición de un agonista de los receptores  $A_2$ , CPCA (100  $\mu$ M), al cultivo de copas ópticas lesionadas con KA estimuló la acumulación de 5OHTrp (Fig. 59a) y la actividad TPH (Fig. 59b) respecto al control, tanto si el cultivo tuvo lugar en luz o en oscuridad. La especificidad del efecto del agonista CPCA a través de receptores  $A_2$  se verificó utilizando un antagonista



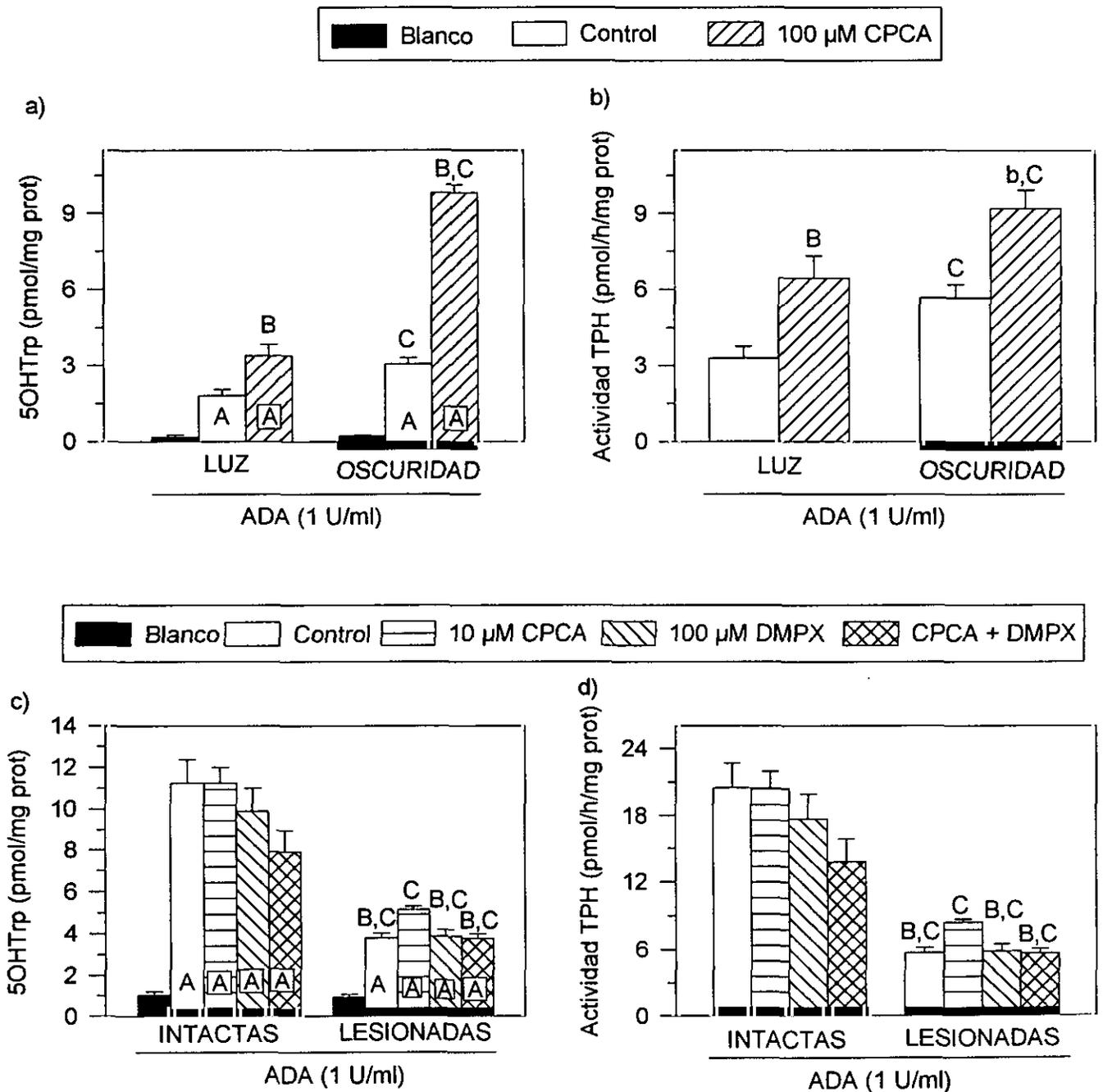
**Figura 56:** Efecto del inhibidor de la recaptura de adenosina, NBTI (10  $\mu$ M) y la adición de ADA (1 U/ml) exógena sobre la actividad NAT de copas ópticas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Las copas ópticas se cultivaron durante 6 horas en oscuridad en presencia de los distintos fármacos. A,  $p < 0,01$  vs el grupo control; B,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con NBTI.



**Figura 57:** Efecto del agonista  $A_1$ ,  $N^6$ -ciclohexiladenosina (CHA, 1  $\mu\text{M}$ ) y del antagonista  $A_1$ , 8-ciclopentil-1,3-dimetilxantina (CPT, 1  $\mu\text{M}$ ) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas intactas y lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu\text{M}$ ), las copas ópticas fueron cultivadas en SC con 1 U/ml de ADA durante 4 horas en oscuridad. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción fue 62,5  $\mu\text{M}$ . Las letras muestran las significaciones estadísticas: minúsculas  $p < 0,05$ , mayúsculas  $p < 0,01$ . A, vs el grupo blanco; b, vs el grupo control; C, vs retinas intactas.



**Figura 58:** Efecto del agonista  $A_1$ , N<sup>6</sup>-ciclohexiladenosina (CHA, 1  $\mu$ M), sobre la actividad NAT en las retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Las copas ópticas fueron cultivadas en SC suplementada con 1 U/ml de ADA durante 6 horas en luz o oscuridad (barra negra en la base de las columnas). A,  $p < 0,01$  vs el grupo cultivado en luz.



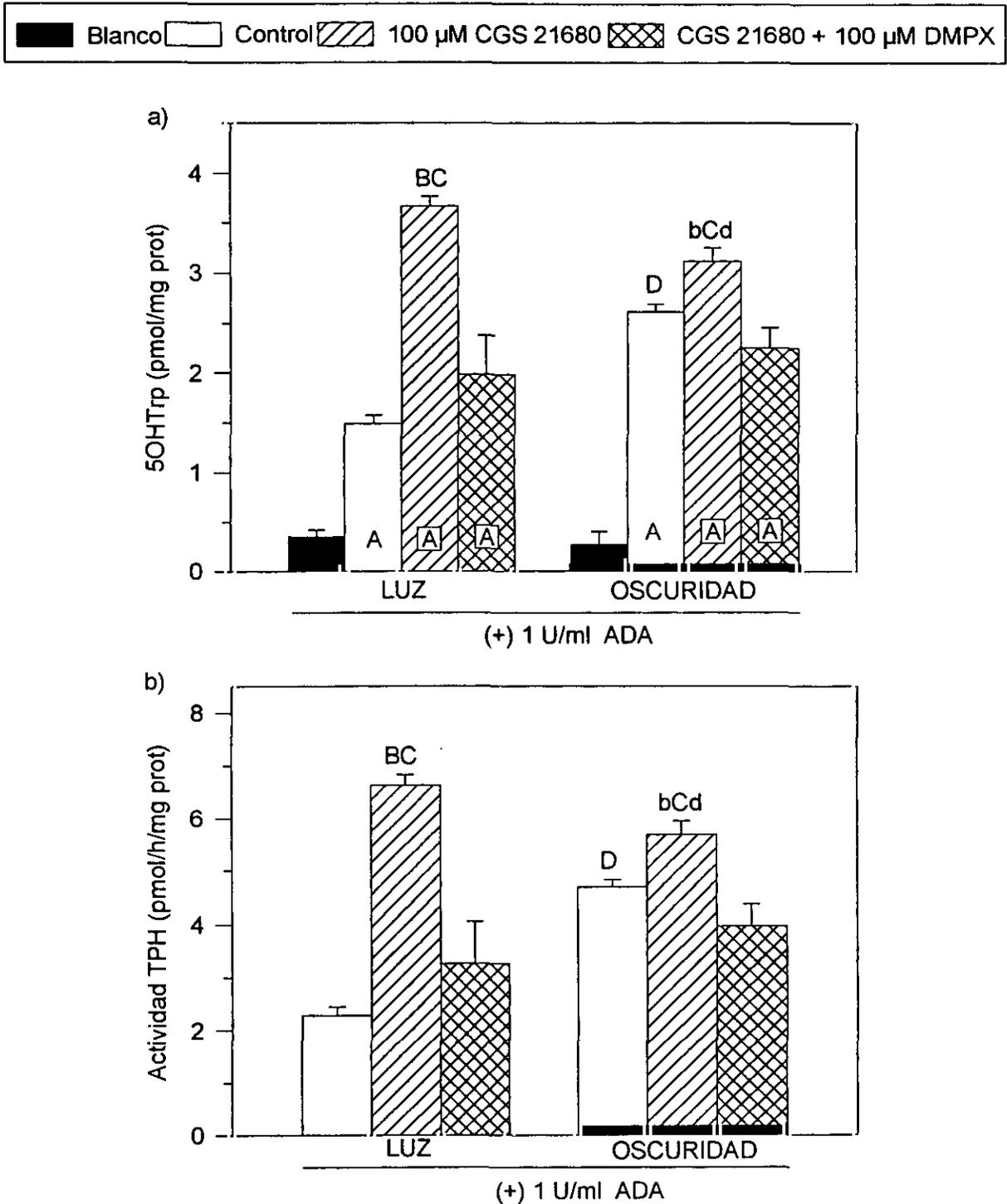
**Figura 59:** Efecto del agonista  $A_2$ , N<sup>5</sup>-ciclopropil-carboxamidoadenosina (CPCA, 100 μM), y del antagonista  $A_2$ , 3,7-dimetil-1-propargilxantina (DMPX, 100 μM) sobre a) y c) la acumulación de 5OHTrp y b) y d) la actividad TPH en retinas intactas (c y d) y lesionadas con KA (a y b) de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del mHBH (10 μM) las copas ópticas fueron cultivadas en SC con 1 U/ml de ADA durante 4 horas en luz o oscuridad. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, la concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción fue 62,5 μM. Las letras muestran las significaciones estadísticas: minúsculas p<0,05, mayúsculas p<0,01. A, vs el grupo blanco; b, vs el grupo control; C, vs retinas intactas.

específico de dichos receptores, DMPX (100  $\mu$ M). En las figuras 59c y d se muestra que, en las retinas lesionadas con KA cultivadas en oscuridad, el CPCA volvió a estimular la acumulación de 5OHTrp y la actividad TPH a una concentración 10 veces menor que en el experimento anterior pero no tuvo ningún efecto en las retinas intactas. El efecto estimulador del CPCA sobre la actividad TPH de las retinas lesionadas se bloqueó por el DMPX. La adición de otro agonista  $A_2$ , concretamente un agonista específico para el subtipo de receptor  $A_{2A}$ , CGS 21680 (100  $\mu$ M), también estimuló la acumulación de 5OHTrp y la actividad TPH en luz y oscuridad siendo dicho incremento bloqueado por el antagonista DMPX (Fig. 60 a y b). Estos resultados confirman que los efectos de la adenosina sobre la actividad TPH se realizan a través de receptores  $A_2$ , más concretamente el subtipo  $A_{2A}$ .

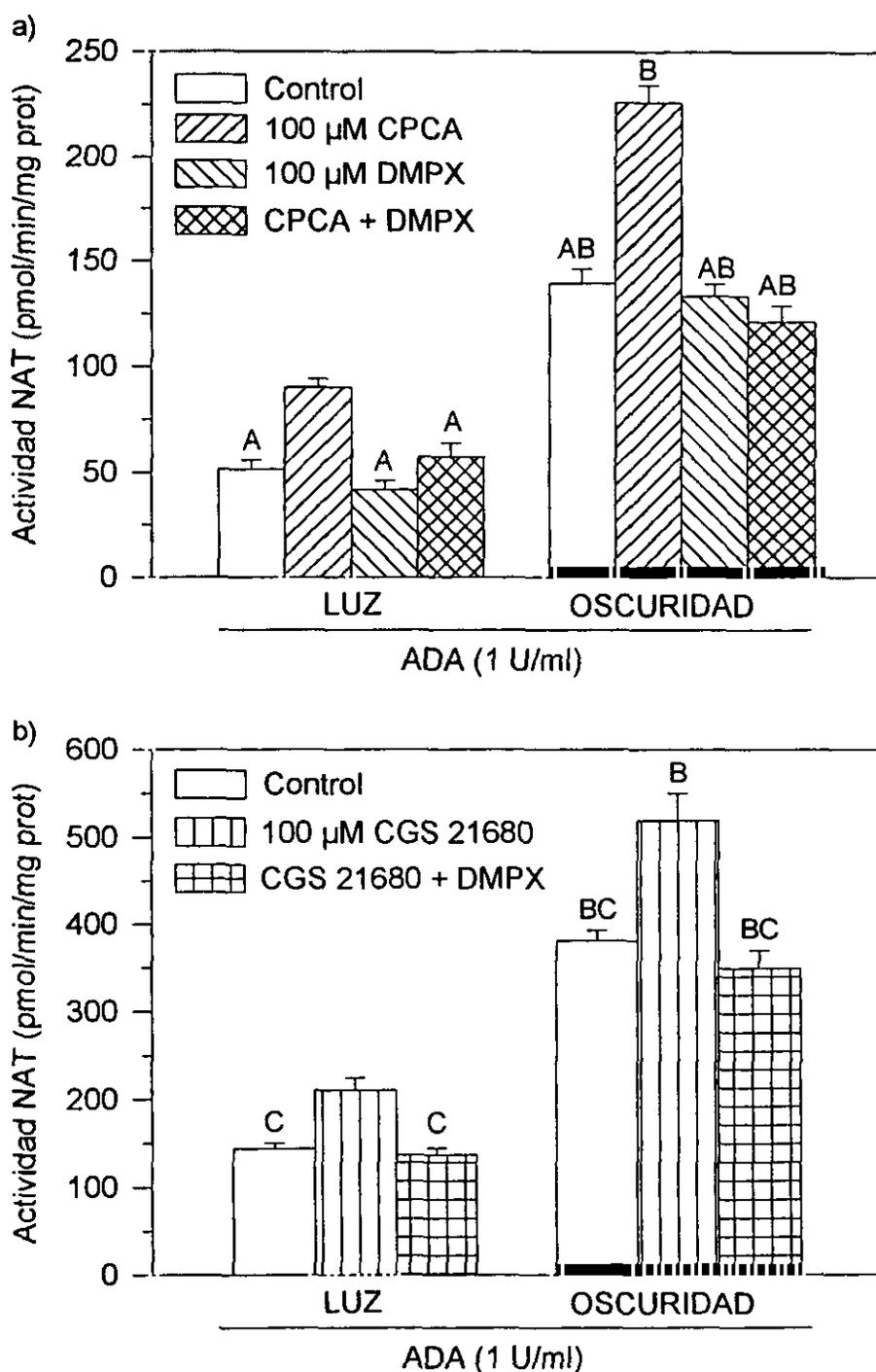
En la figura 61 se observa que la actividad NAT mostró una regulación paralela a la de la actividad TPH. El agonista  $A_2$ , CPCA incrementó la actividad NAT respecto al control tanto cuando el cultivo se realizó en luz como en oscuridad, siendo el efecto estimulador del CPCA bloqueado por DMPX. El mismo resultado se obtuvo cuando se utilizó el agonista  $A_{2A}$ , CGS 21680. Estos resultados confirman que los efectos de la adenosina sobre la síntesis de melatonina se realizan a través de receptores  $A_{2A}$ .

### **c) Segundos mensajeros implicados en la regulación de la síntesis de melatonina por adenosina.**

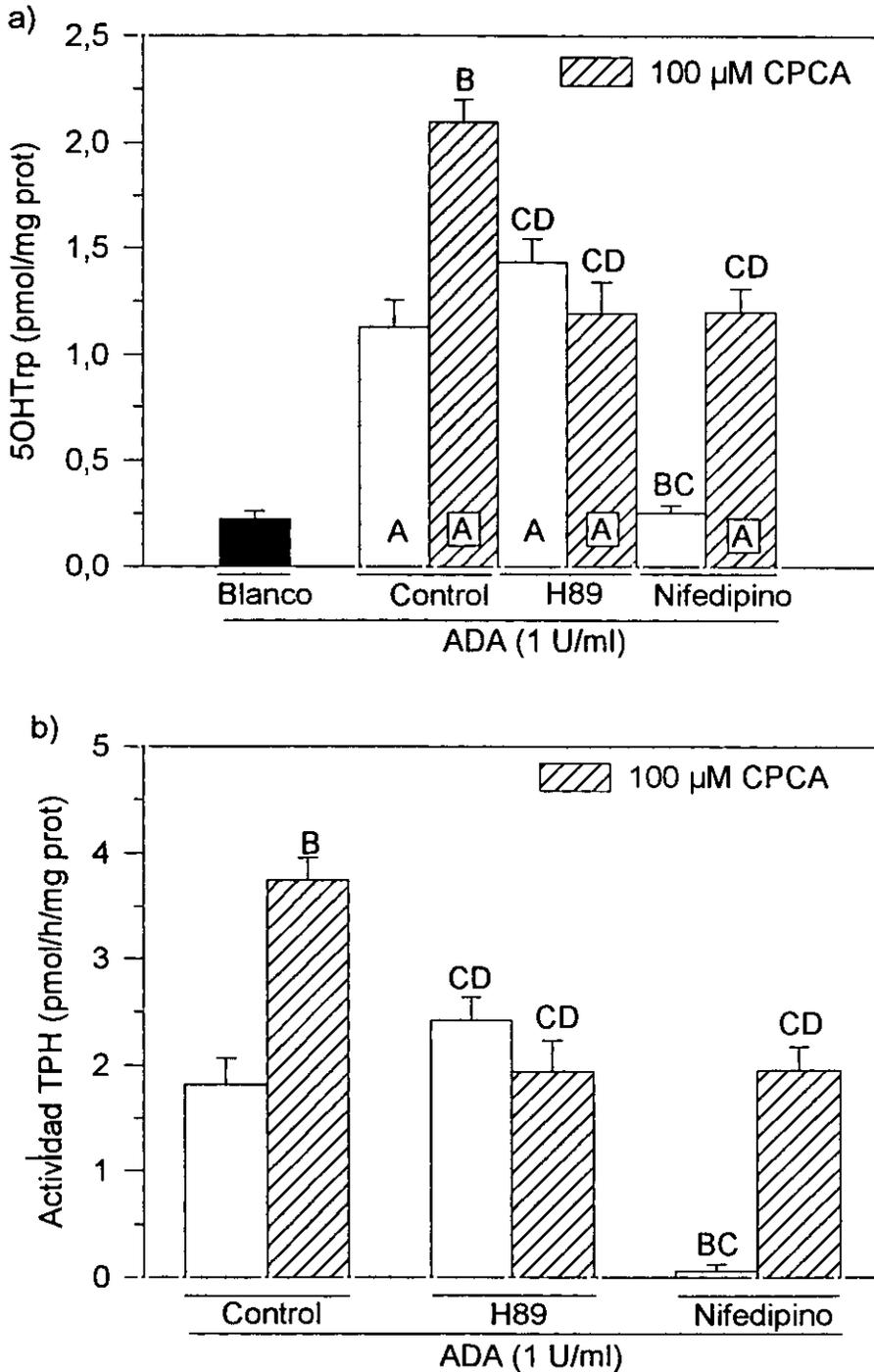
Una vez demostrado que la adenosina está regulando positivamente la síntesis de melatonina, nuestro siguiente objetivo fue determinar qué sistemas de segundos mensajeros están implicados en la transmisión de la señal. En la figura 62 se observa que, en retinas lesionadas con KA cultivadas en luz, el efecto estimulador del CPCA sobre la acumulación de 5OHTrp y la actividad TPH desaparece en presencia del inhibidor de la PKA, H89. La adición de nifedipino al cultivo redujo drásticamente los niveles basales de actividad TPH mientras que la adición conjunta de nifedipino y CPCA resultó en unos valores de actividad TPH indistinguibles de los controles (Fig. 62b), siendo el CPCA capaz de estimular la actividad TPH aún en presencia de nifedipino.



**Figura 60:** Efecto del agonista CGS 21680 (100 μM) y antagonista A<sub>2</sub>, 3,7-dimetil-1-propargilxantina (DMPX, 100 μM) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Previamente a la adición del 10 μM mHBH las copas ópticas fueron cultivadas en SC con 25 μM de L-Trp y 1 U/ml de ADA durante 4 horas en luz o oscuridad. El tiempo de reacción fue de 30 minutos y concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción de 62,5 μM. Las letras muestran las significaciones estadísticas indicando las minúsculas p<0,05 y las mayúscula p<0,01. A vs el grupo blanco; B vs el grupo control; c vs el grupo tratado con DMPX más CPCA; D vs las retinas cultivadas en luz.

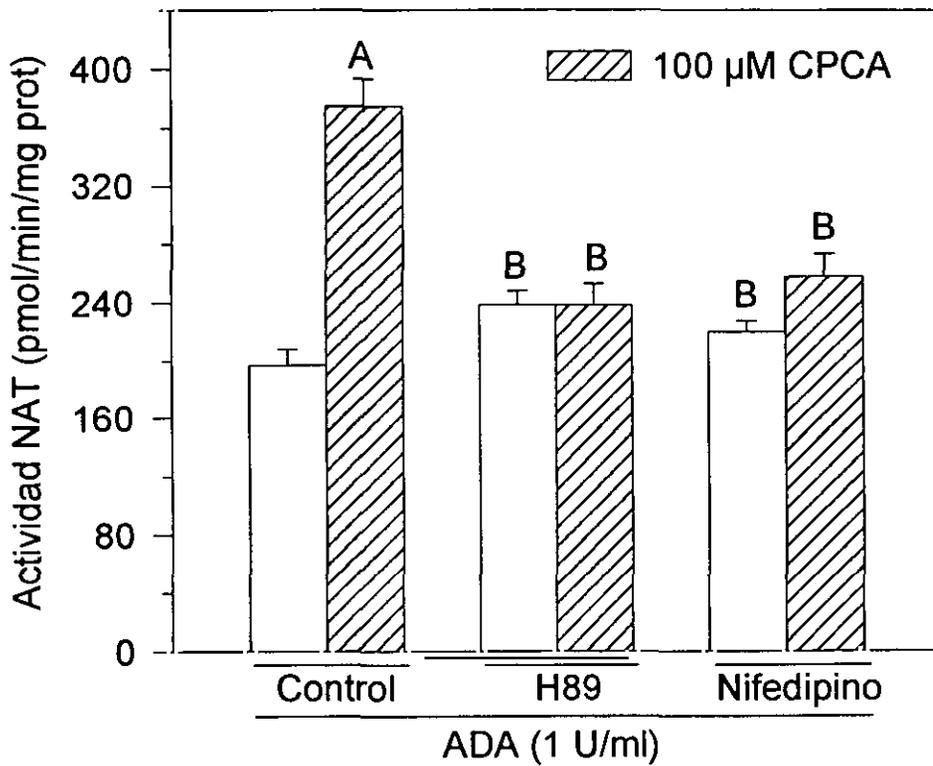


**Figura 61:** Efecto de los agonistas  $A_2$ ,  $N^5$ -ciclopropil-carboxamidoadenosina (CPCA, 100  $\mu$ M) y CGS 21680 (100  $\mu$ M), y del antagonista  $A_2$ , 3,7-dimetil-1-propargilxantina (DMPX, 100  $\mu$ M), sobre la actividad NAT en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis*. Las copas ópticas fueron cultivadas en SC suplementado con 1 U/ml de ADA durante 6 horas en luz o oscuridad. A,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con CPCA. B,  $p < 0,01$  vs las retinas cultivadas en luz; C,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con CGS 21680.



**Figura 62:** Efecto del inhibidor de la PKA, H89 (200  $\mu$ M) y del bloqueante de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, nifedipino (10  $\mu$ M) en las retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis* tratadas con el agonista  $\text{A}_2$ , CPCA (100  $\mu$ M) sobre a) la acumulación de 5OHTrp y b) la actividad TPH. Previamente a la adición del mHBH (10  $\mu$ M), las copas ópticas fueron cultivadas en SC con 1 U/ml de ADA durante 4 horas en luz. El tiempo de reacción fue de 30 minutos, la concentración de L-Trp durante el tiempo de reacción fue 62,5  $\mu$ M. A,  $p < 0,01$  vs el grupo blanco; B,  $p < 0,01$  vs el grupo control; C,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con CPCA; D,  $p < 0,01$  vs el grupo tratado con nifedipino.

Cuando se repite el experimento valorando la actividad NAT encontramos que ni el H89 ni el nifedipino tuvieron efecto por sí mismos sobre la actividad basal pero bloquearon el efecto estimulador del CPCA (Fig. 63). Estos resultados sugieren que en la regulación de la síntesis de melatonina por la adenosina intervendrían mecanismos dependientes de cAMP y calcio.



**Figura 63:** Efecto del inhibidor de la PKA, H89 (200 μM) y del bloqueante de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L, nifedipino (10 μM) en retinas lesionadas con KA de *Xenopus laevis* tratadas con el agonista A<sub>2</sub>, CPCA (100 μM) sobre la actividad NAT. Las copas ópticas fueron cultivadas en SC suplementado con 1 U/ml de ADA durante 6 horas en luz. A, p<0,01 vs el grupo control; B, p<0,01 vs el grupo tratado con CPCA.

## **V. DISCUSIÓN**

## **1. LESIÓN DE LA RETINA CON EL ÁCIDO KAÍNICO COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA.**

En esta memoria hemos demostrado que la inyección intraocular del agonista glutaminérgico, KA, es un buen método para obtener copas ópticas enriquecidas en fotorreceptores en *Xenopus laevis*. La obtención de estas preparaciones de fotorreceptores ha sido el primer paso imprescindible para la realización del resto de los experimentos de esta memoria.

### **a) Tiempo de actuación**

Aunque nosotros no hemos realizado ningún estudio sobre la evolución temporal de la toxicidad en la retina provocadas por la exposición al KA, estudios anteriores han demostrado que la acción del neurotóxico es lenta y progresiva. De este modo, aunque se encuentran daños en la IPL y la INL, especialmente en las células bipolares y amacrinas, a tiempos tan cortos como 30 minutos (Yazulla y Kleinschmidt, 1980; Pérez *et al.*, 1997), los grandes cambios ocurren en los dos primeros días, estabilizándose posteriormente. Por tanto, una semana (tiempo utilizado para la realización de los experimentos de esta memoria) es tiempo suficiente para reflejar el resultado final de la muerte neuronal selectiva (Yazulla y Kleinschmidt, 1980; Dvorack y Morgan, 1983; Pérez *et al.*, 1997).

### **b) Tipos celulares afectados por el neurotóxico**

Las lesiones encontradas por nosotros en la retina de *Xenopus laevis* son muy similares a las descritas para la retina de otras clases de vertebrados, reflejando una gran pérdida neuronal. Los cambios más profundos se manifiestan en las capas plexiformes externa e interna y en la INL, desapareciendo la mayoría de las neuronas de la retina interna (Yazulla y Kleinschmidt, 1980; Morgan e Ingham, 1981; Hampton *et al.*, 1981; Kleinschmidt *et al.*, 1986; Thomas *et al.*, 1993). Los tipos celulares más afectados son las células horizontales, amacrinas y bipolares, mientras que el KA no afecta a las células de Müller. Estudios recientes de inmunohistoquímica no detectan receptores de glutamato subtipo kainato en las células de Müller, lo que explicaría el hecho de que estas células sean resistentes a la acción del KA (Peng *et al.*, 1995; Kawasaki *et al.*, 1996). Es más, se ha descrito que la inyección intraocular de KA puede causar gliosis (Sahel *et al.*, 1991; Villani *et al.*, 1995). Por tanto, posiblemente los escasos núcleos de células que quedan en la INL

después de la lesión sean mayoritariamente células de Müller, aunque no se puede descartar que también sobreviva algún subtipo neuronal resistente a la lesión.

En la bibliografía disponible, existen muy pocos estudios que identifiquen de un modo directo, los tipos celulares que son afectados por la lesión con KA. Yaqud y Eldred en 1993 realizaron un estudio inmunohistoquímico en la retina de *Pseudemys scripta elegans*, encontrando que una semana después de la inyección intraocular de KA la distribución de la inmunoreactividad frente a un gran número de neurotransmisores estaba muy alterada. De este modo, la inmunoreactividad frente a glucagón, encefalinas, neurotensina, serotonina, GABA y la actividad GAD desaparece completamente, indicando una pérdida masiva de estos tipos neuronales, mientras que se altera la localización de la inmunoreactividad frente a glicina y glutamato. Esta gran pérdida de neuronas GABAérgicas se confirma también en mamíferos, donde la inmunoreactividad para GABA prácticamente desaparece y las escasas células marcadas que sobreviven no muestran ninguna funcionalidad (Pérez y Davanger, 1994; Osborne *et al.*, 1995). Además, estudios neuroquímicos realizados en peces (Villani *et al.*, 1995) y aves (Zawilska e Iuvone, 1992) hallan una gran reducción de la actividad GAD después de la lesión con KA. Estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos realizados en aves también sugieren una gran pérdida de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas ya que el contenido dopamina, tirosina hidroxilasa y serotonina ocular después de la lesión con KA se reduce notablemente respecto al control, desapareciendo también toda la inmunoreactividad frente a serotonina en las retinas lesionadas (Schwarcz y Coley, 1977; Zawilska e Iuvone, 1992; Thomas *et al.*, 1993). Estos resultados están de acuerdo con la reducción de la actividad GAD y del contenido de dopamina y serotonina en la retina encontrada por nosotros en *Xenopus laevis*.

Todos los trabajos consultados encuentran que los fotorreceptores son resistentes a la neurotoxicidad del KA, no mostrando ningún síntoma morfológico de lesión celular, incluso una semana después de la lesión (Yazulla y Kleinschmidt, 1980; Hampton *et al.*, 1981; Morgan e Ingham, 1981; Thomas *et al.*, 1993; Yaqud y Eldred, 1993). Estos datos histológicos concuerdan con los datos neuroquímicos que demuestran que ni los niveles endógenos ni el comportamiento de las actividades NAT y HIOMT, así como del contenido retiniano de melatonina se alteran después de la inyección intraocular de KA (Zawilska e Iuvone, 1992; Thomas *et al.*, 1993). Al igual que ocurría para las células de Müller, la resistencia de los

fotorreceptores al KA parece deberse a la ausencia de este subtipo de receptores glutaminérgicos en este tipo celular (Peng *et al.*, 1995).

La resistencia de las células fotorreceptoras al KA y la extrema vulnerabilidad de las neuronas serotoninérgicas a sus acciones excitotóxicas, hacen que la inyección intraocular de KA sea una herramienta farmacológica muy útil para el estudio de la fisiología y la neuroquímica del fotorreceptor. Por tanto, este modelo experimental es la herramienta farmacológica idónea para el estudio de la actividad TPH de las células fotorreceptoras que constituye el principal objetivo de esta memoria.

### c) Mecanismo de acción

El mecanismo de las acciones citotóxicas del KA fue descrito por primera vez por Olney en 1978 en la denominada hipótesis excitotóxica. El KA produce una apertura tónica y prolongada de este tipo de canal provocando un desequilibrio iónico en la célula debido a la entrada masiva de iones sodio acompañado de la salida de iones potasio (Kleinschmidt *et al.*, 1986). Este movimiento de iones provocaría la despolarización de la célula con la consiguiente apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje provocando una entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  y una elevación sostenida de sus niveles intracelulares, sobrepasando la capacidad de regulación y tamponamiento de la célula (Duarte *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 1996). En el caso de colocarse en la misma célula receptores de NMDA, la despolarización también provocaría una apertura sostenida de este tipo de canales lo que contribuiría a una mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , potenciando los efectos citotóxicos del KA (Duarte *et al.*, 1996). Esta elevación sostenida del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provocaría una entrada de iones Cl y de agua desde el exterior celular, que serían los principales responsables de la vacuolización que se observa en los primeros estados del daño celular (Kleinschmidt *et al.*, 1986). Simultáneamente, la elevación de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  produce una activación de la óxido nítrico sintetasa y la xantina oxidasa aumentando notablemente la producción de radicales libres (Zeevalk y Nicklas, 1994; Dutrait *et al.*, 1995). Los elevados y sostenidos niveles de radicales libres provocarían una lenta fragmentación del DNA que finalmente conduciría a una muerte celular por apoptosis (Pérez *et al.*, 1997). En ningún caso se han encontrado indicaciones de que la muerte celular tenga lugar por necrosis (Pérez *et al.*, 1997).

#### d) Ventajas sobre otros métodos descritos

El mecanismo de acción del KA hace idóneo su uso para el aislamiento de fotorreceptores retinianos. La primera ventaja es la alta especificidad y selectividad de este método. La neurotoxicidad del KA es altamente selectiva ya que este fármaco únicamente va a afectar a las células que posean receptores de glutamato ionotrópicos subtipo kainato (Cazevielle y Osborne, 1991; Villani *et al.* 1995; Vorwerk, 1996). En la retina de vertebrados, los receptores de glutamato tipo kainato se encuentran ampliamente distribuidos, habiéndose descrito su presencia en la mayoría de las neuronas horizontales, bipolares y amacrinas, así como en una pequeña subpoblación de células ganglionares (Peng *et al.*, 1995; Dixon y Copenhagen, 1992; Euler *et al.*, 1996; Laufer *et al.*, 1996). Esta distribución de los receptores coincide con las lesiones observadas tras la inyección intraocular de KA y permiten obtener retinas que poseen únicamente fotorreceptores, células de Müller y escasas células ganglionares. Por tanto, no sólo el empleo del KA sino también el de cualquier agonista de los receptores de glutamato subtipo kainato con características farmacológicas similares al KA, como por ejemplo el ácido domoico (Duran *et al.*, 1995), es una herramienta útil para la obtención de retinas enriquecidas en fotorreceptores.

Aunque el carácter selectivo del neurotóxico KA también lo comparten otros fármacos, como los agonistas de los receptores de NMDA, la distribución restringida de este subtipo de receptor, sólo presente en las células ganglionares y algunas células amacrinas (Brandstätter *et al.*, 1994), hacen que tras la inyección ocular de estos neurotóxicos únicamente se observen cambios en la IPL, no habiendo apenas pérdida neuronal en la INL (Morizane *et al.*, 1997). Estos resultados se confirman en experimentos *in vitro* que demuestran que el daño neuronal provocado por los agonistas de los receptores de NMDA es mucho menor que el inducido por los agonistas de receptores de kainato (Izumi *et al.*, 1995). Es más, estudios inmunohistoquímicos demuestran que la adición de NMDA en concentraciones excitotóxicas a un cultivo de copas ópticas no modifica la inmunoreactividad para glucagón, encefalinas, neurotensina, aspartato y serotonina, disminuyendo únicamente la inmunoreactividad para GABA y glicina. Por tanto, la resistencia de las células amacrinas serotoninérgicas a la toxicidad de los agonistas NMDA, hace a estos neurotóxicos inapropiados para nuestro estudio.

Recientemente, se ha descrito un método de aislamiento químico usado con éxito para obtener fotorreceptores de la retina de *Xenopus laevis* (Cahill y Besharse, 1992). Este método se

basa en la lisis de la retina interna y las capas plexiformes con detergentes, concretamente Triton X-100, obteniéndose una retina que únicamente posee fotorreceptores. Este método posee la ventaja de obtener preparaciones libres de cualquier tipo celular a parte de los fotorreceptores, mientras que en las lesiones con KA siempre sobreviven las células de Müller y algunas ganglionares. Además, las lesiones con detergentes son un procedimiento rápido, ya que todo el proceso de lesión puede llevarse a cabo en un par de horas, frente a una semana tras la inyección que requieren las lesiones con KA. Sin embargo, presenta el inconveniente de que la lisis no es selectiva y el detergente va ir dañando los distintos tipos celulares únicamente en función del tiempo de exposición y la proximidad de los distintos tipos celulares a la superficie de la retina atacada por el detergente. De este modo, en el método original, en 1 de cada 12 retinas, los fotorreceptores resultan dañados irreversiblemente perdiendo totalmente su funcionalidad y capacidad de sintetizar de melatonina (Cahill y Besharse, 1992), existiendo siempre un porcentaje de riesgo bastante elevado de daño parcial de las células fotorreceptoras, o de destrucción sólo de parte de las neuronas de la retina interna. De hecho, en los tres experimentos, donde se realizaron lesiones con Triton X-100 en esta memoria, se encontró que para obtener una reducción de la actividad GAD del 68,3%, se producía daño celular en aproximadamente la mitad de las células fotorreceptoras (reducción al 45% de su actividad NAT). Por tanto, la falta de selectividad del Triton X-100 comparado al método del KA, convierten a este método de lisis en un procedimiento poco repetitivo.

También se han descrito métodos de aislamiento de fotorreceptores basados en procedimientos mecánicos o enzimáticos. Los métodos mecánicos no suele dañar los fotorreceptores. Es más, cultivados en el medio adecuado, pueden conservar su funcionalidad durante una semana (Leibovic, 1986). Sin embargo, tienen el inconveniente que se obtiene una suspensión de todos los tipos celulares de la retina siendo imposible el aislamiento únicamente de las células fotorreceptoras. De este modo, aunque estos métodos son adecuados y útiles para estudios electrofisiológicos o técnicas donde se puedan realizar mediciones en células individuales, no son adecuadas para nuestro tipo de estudio. Los métodos enzimáticos permiten obtener preparaciones enriquecidas en fotorreceptores (Denton *et al.*, 1992; Adler *et al.*, 1984), por lo que serían una alternativa a las lesiones oculares con KA. Sin embargo, normalmente estas técnicas son caras y su proceso de realización es lento.

## 2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH EN CÉLULAS FOTORRECEPTORAS.

### 2.1. REGULACIÓN POR FACTORES EXÓGENOS: EFECTO DEL FOTOPERIODO.

Para el estudio de la regulación de la actividad TPH por el fotoperiodo hemos utilizado un método de valoración de la actividad TPH *in vivo*. Este método posee una serie de ventajas frente a las determinaciones de la actividad enzimática *in vitro* como son el hecho de que las mediciones se realizan a las concentraciones fisiológicas de sustratos y cofactores. Por tanto, permite determinar la actividad enzimática de un modo rápido, reflejando los niveles reales de actividad presentes en el momento del sacrificio del animal. Los primeros trabajos que describían este método de valoración *in vivo* determinaban la formación de serotonina en lugar de la de 5OHTrp (Hamon *et al.*, 1973; 1979). Sin embargo, esta aproximación no refleja directamente la actividad TPH ya que varía dependiendo del contenido inicial de serotonina en el tejido y de la actividad AAAD.

Este es el primer trabajo describiendo un ritmo diario de actividad TPH en la retina de *Xenopus laevis*. Tanto los niveles de actividad enzimática como el perfil del ritmo diario son diferentes en las retinas intactas y lesionadas con KA, indicando una regulación distinta de la actividad enzimática entre los fotorreceptores y las neuronas serotoninérgicas. Sin embargo, los niveles y las variaciones del contenido de mRNA de la TPH de las retinas intactas es indistinguible del de las retinas lesionadas con KA. Esta discrepancia en los niveles de mRNA y de actividad enzimática en la retina de *Xenopus laevis* ha sido previamente descrita por Green *et al.*, 1995b. Estudios de hibridación *in situ* demuestran que en esta especie de anuro el mRNA de la TPH se localiza en los fotorreceptores. Sin embargo, la actividad enzimática en retinas tratadas con detergentes es menor que en retinas intactas, sugiriendo que parte de la actividad TPH retiniana se localiza en otras células distintas al fotorreceptor. Nosotros hemos encontrado que tras la lesión con KA, el contenido de actividad TPH se reduce al 13% del de las retinas intactas, mientras que los niveles de mRNA no se ven afectados. Estos datos corroboran que, si bien prácticamente la totalidad del mRNA de la TPH de la retina se localizaría en los fotorreceptores, sólo una pequeña parte de la actividad enzimática se encontraría en este tipo celular. Es más, estudios de inmunohistoquímica localizan la inmunorreactividad para TPH únicamente en células amacrinas indicando que la mayor parte de la enzima se localizaría en las neuronas

serotoninérgicas (Zhu *et al.*, 1992). Por tanto, podemos concluir que la actividad TPH en la retina de *Xenopus laevis* se localiza en las neuronas amacrinas y en los fotorreceptores. La serotonina sintetizada en las neuronas va a servir de neurotransmisor retiniano, mientras que la sintetizada en los fotorreceptores sirve como precursor de la síntesis de melatonina.

Posiblemente, los distintos tipos celulares que contribuyen al contenido total de serotonina dependa de la especie estudiada. De este modo, en la retina del pollo, al contrario de lo que acabamos de ver para *Xenopus laevis*, parece que los fotorreceptores son la mayor fuente productora de serotonina. En esta especie, el número de neuronas amacrinas que muestran inmunorreactividad para TPH es mucho menor que en *Xenopus laevis* (Wilhem *et al.*, 1993). Además, la actividad TPH de la retina tras la lesión con KA no se modifica, e incluso la actividad específica es ligeramente mayor que la encontrada en retinas intactas debido a la reducción del espesor de la retina (Thomas *et al.*, 1993).

La discrepancia entre los niveles de mRNA y la cantidad de enzima de la TPH también ha sido descrita para el cerebro de rata (Dumas *et al.*, 1989). En esta especie, aunque la inmunorreactividad para la proteína de la TPH es similar en la glándula pineal y en el núcleo del Rafe, la glándula pineal muestra unos niveles muy elevados de mRNA de la TPH, mientras que son prácticamente indetectables en el núcleo de Rafe. Estas diferencias pueden explicarse tanto por diferencias en la eficacia de traducción del mRNA de la TPH entre ambos tejidos (Dumas *et al.*, 1989) como por diferencias en la estabilidad de la proteína de la TPH y de su mensajero. La tasa de recambio de la TPH en la glándula pineal de rata es rápida (75 min, Sitaram y Lees, 1978) mientras que en otra áreas del cerebro es lenta (2-3 días; Meek y Neff, 1972). Estos fenómenos también podrían explicar las diferencias encontradas entre los distintos tipos celulares de la retina. Los fotorreceptores de la retina comparten muchas características con los pinealocitos, mientras que las neuronas serotoninérgicas retinianas son similares a las cerebrales. Sin embargo, aunque nosotros no hemos estudiado la vida media de la actividad TPH en la retina, nuestros resultados sugieren que la enzima localizada en los fotorreceptores es relativamente estable, ya que sus niveles de actividad permanecen constantes después de 6 horas en presencia de actinomicina D, aunque sus niveles de mRNA disminuyan drásticamente.

El perfil del ritmo diario de la actividad TPH es también distinto entre las retinas intactas y las lesionadas con KA. En las retinas intactas, el máximo de actividad tiene lugar en la mitad de la fase luminosa mientras que en las retinas lesionadas con KA ocurre hacia la mitad de la fase oscura. Este ritmo de la actividad TPH localizada en los fotorreceptores es paralelo al descrito para la actividad NAT (Besharse e Iuvone, 1983) y la síntesis de melatonina (Cahill y Besharse, 1990; 1991) en la retina y en los fotorreceptores aislados de esta misma especie, confirmando el importante papel jugado por la actividad TPH en la regulación del contenido retiniano total de melatonina en *Xenopus laevis*.

También han sido descritas oscilaciones diarias de la actividad TPH en la glándula pineal de la rata (Sitaram y Lees, 1978; Shibuya *et al.*, 1978; Sudgen *et al.*, 1989; Ehret *et al.* 1991) y en la retina del pollo (Thomas e Iuvone, 1991). Tanto la amplitud el ritmo (2-4 veces) como el momento del máximo nocturno (aproximadamente 5-7 horas después del inicio de la fase oscura) en estas especies son muy similares a los encontrados por nosotros en los fotorreceptores retinianos de *Xenopus laevis*, confirmando que la serotonina producida por este tipo celular se utiliza fundamentalmente en la síntesis de melatonina.

También se han descrito oscilaciones diarias de la actividad TPH y el contenido de serotonina en el cerebro. La presencia de un ritmo y el perfil del mismo, varía mucho dependiendo del área cerebral considerada y la especie estudiada, por lo que es difícil extraer generalizaciones. Nuestro trabajo sugiere que, en la retina, las neuronas serotoninérgicas muestran un ritmo de actividad TPH con sus valores mayores durante la fase luminosa del fotociclo diario. Por lo que conocemos, solo existe otro trabajo que estudie las variaciones diarias de la actividad TPH en la retina. Thomas y colaboradores en 1993, encontraron que en el pollo, tanto las retinas intactas como las lesionadas con KA muestran un ritmo diario de su actividad TPH cuyos niveles máximos ocurren durante la fase oscura del fotociclo diario. Aunque los resultados obtenidos en este último estudio para las retinas intactas parezcan diferir de los nuestros, conviene considerar que, en el pollo la amplitud del ritmo de la actividad TPH es mucho mayor en las retinas lesionadas con KA (12 veces) que en las retinas intactas (4 veces), indicando que las neuronas serotoninérgicas en esta especie, o bien carecen de ritmo, o la amplitud es mucho menor o incluso presentan un ritmo invertido con respecto a los fotorreceptores, como hemos visto para la retina de *Xenopus laevis*. Es más, si consideramos que estudios inmunohistoquímicos demuestran que el número de

neuronas serotoninérgicas en la retina de pollo es pequeño (Wilhelm *et al.*, 1993), al contrario de lo descrito para la retina de *Xenopus laevis* donde son muy abundantes (Zhu *et al.*, 1992), podemos concluir que en el pollo, la actividad TPH retiniana refleja principalmente la enzima presente en los fotorreceptores.

En esta memoria también hemos encontrado diferencias en los niveles de mRNA de la TPH entre dos momentos del día, ZT1 y ZT13. El contenido de mRNA de la TPH fue idéntico en retinas intactas y lesionadas con KA, con niveles mayores al inicio de la fase oscura. Estos datos coinciden con el ritmo circadiano de abundancia de mRNA *in vivo* e *in vitro* descrito previamente para retinas de *Xenopus laevis* (Green y Besharse, 1995; Green *et al.*, 1995). Aunque estos autores no determinaron el ritmo de mRNA en fotorreceptores aislados, estudios de hibridación *in situ* sugieren que, al contrario de lo descrito para la actividad enzimática, en *Xenopus* el mRNA de la TPH se localizaría mayoritariamente en los fotorreceptores, por lo que las variaciones de mRNA de la TPH reflejarían las variaciones en el fotorreceptor. Nuestros datos confirman dicha hipótesis.

En 1996, se describió un ritmo de expresión de la TPH en la glándula pineal y en los pinealocitos de pollo con un perfil paralelo al hallado en la retina de *Xenopus laevis* (Florez *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1996). Este ritmo concuerda con las variaciones día-noche encontradas en la cantidad de enzima en la glándula pineal (Florez y Takahasi, 1996a) y en la actividad enzimática de la retina de esta especie (Thomas e Iuvone, 1991).

Actualmente, también se han descrito ritmos circadianos de la expresión de la NAT, la otra enzima reguladora de la ruta biosintética de melatonina, en la glándula pineal de mamíferos y aves (Coon *et al.*, 1995; Roseboom *et al.*, 1996; Bernard *et al.*, 1997) y en la retina de aves (Bernard *et al.*, 1997). En todos los casos, al igual que lo descrito para la TPH, los valores máximos de abundancia de mRNA ocurren durante la fase oscura. Sin embargo, la amplitud del ritmo es muy distinta dependiendo de la especie estudiada. En la glándula pineal de rata, los ritmos del mRNA y de la actividad de la NAT son similares (incremento nocturnos de unas 150 veces), pero en la oveja, los valores nocturnos de mRNA de la NAT sólo llegan a duplicarse mientras que la actividad enzimática aumenta 7 veces. Estos resultados sugieren que, si bien en la rata el ritmo

circadiano de expresión génica sería el principal responsable de la actividad enzimática total, en la oveja estarían implicados otros mecanismos postranscripcionales y postrasduccionales.

En conjunto, estos resultados sugieren que en la retina de vertebrados, la síntesis de melatonina está regulada en parte por un reloj circadiano que controla los ritmos de la expresión de las dos enzimas reguladoras de la ruta biosintética, TPH y NAT. De hecho, en aves y en anfibios, se ha demostrado que el oscilador se encuentra en los fotorreceptores (Cahill y Besharse, 1991; Thomas *et al.*, 1993). En estas especies, el ritmo circadiano de melatonina y actividad TPH se mantiene en preparaciones de fotorreceptores. De este modo, los niveles de mRNA de ambas enzimas estarían elevados durante la noche induciendo una mayor producción de moléculas de enzima y en último término un incremento de las actividades enzimáticas. En el caso de la TPH de los fotorreceptores de *Xenopus laevis* esta secuencia de sucesos está demostrada. El ritmo de mRNA de la TPH se encuentra adelantado aproximadamente 4 horas al ritmo de actividad enzimática siendo este tiempo el necesario para la producción y activación de las nuevas moléculas de enzima. Sin embargo, no se puede descartar que en esta especie, al igual que lo descrito para la NAT de la glándula pineal de la oveja, existan mecanismos postranscripcionales que estén influyendo en la actividad enzimática total. Para determinar esta última hipótesis, se estudió el papel de los segundos mensajeros celulares en la regulación de la expresión génica y la actividad enzimática de la TPH.

## **2.2. REGULACIÓN DE LA TPH RETINIANA POR FACTORES ENDÓGENOS: PAPEL DE LOS SEGUNDOS MENSAJEROS**

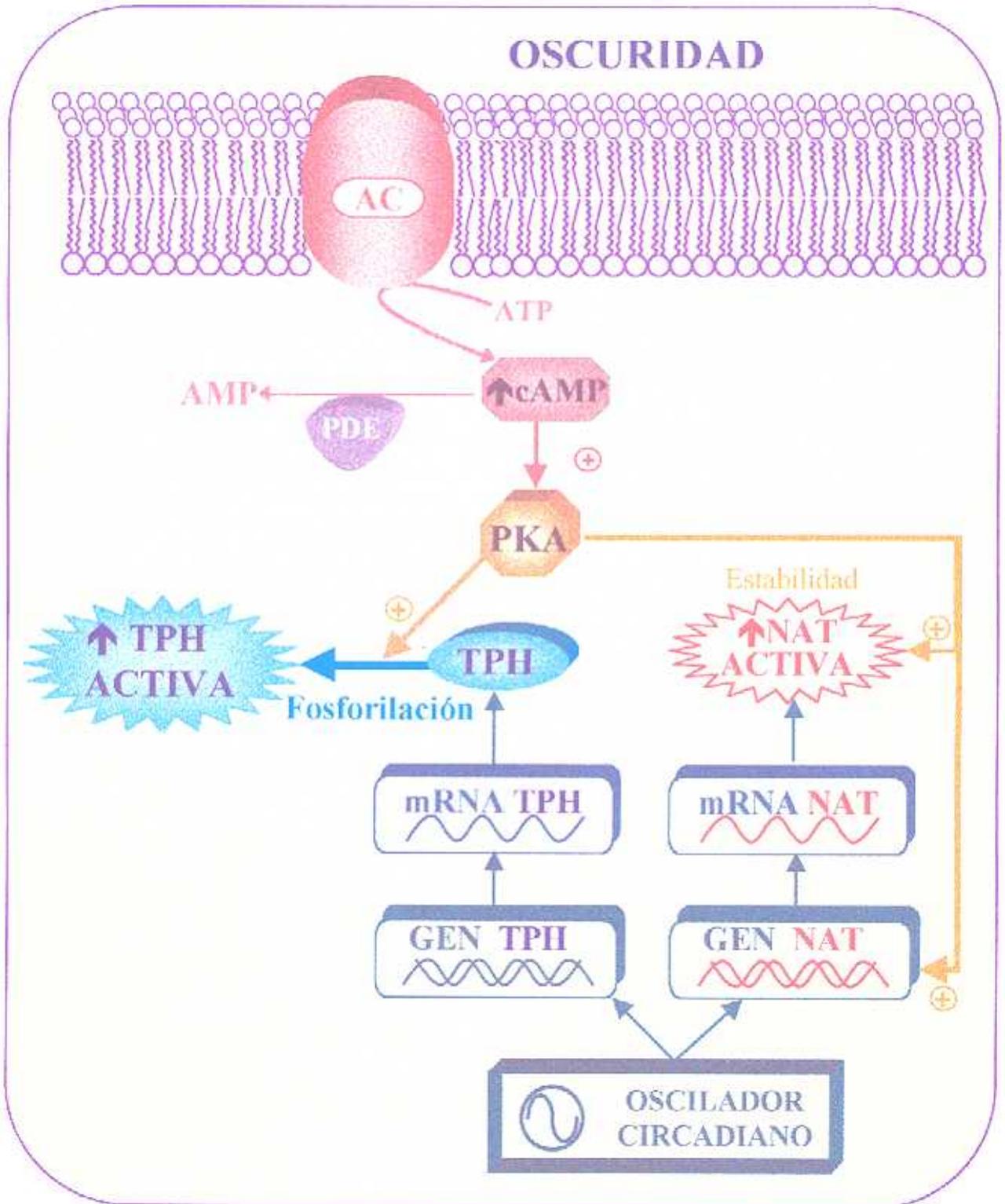
Este es el primer trabajo describiendo la regulación por segundos mensajeros de la actividad TPH en la retina de vertebrados. Aunque existen algunos trabajos sobre los efectos activadores del cAMP y del Ca<sup>2+</sup> en neuronas serotoninérgicas cerebrales (Boadle-Biber, 1980; Sawada y Nagatsu, 1988), por lo que conocemos hasta la fecha existen muy pocos estudios enfocados en el papel jugado por los segundos mensajeros en la regulación de la actividad TPH implicada en la biosíntesis de melatonina. Únicamente, en la glándula pineal de aves y mamíferos se ha descrito que el cAMP aumenta la cantidad de enzima de la TPH (Ehret *et al.*, 1991; Florez y Takahashi, 1996b).

### 2.2.1. PAPEL DE cAMP

En esta memoria se demuestra el importante papel jugado por el cAMP en la regulación de la actividad TPH de fotorreceptores retinianos de *Xenopus laevis* (Esquema 10). Cualquier tratamiento que aumente los niveles intracelulares de cAMP induce una estimulación de la actividad enzimática. Es más, los efectos del cAMP sobre la actividad TPH están mediados por la PKA. Los experimentos realizados acerca del efecto de los inhibidores de los procesos de transcripción y traducción sobre la actividad enzimática y cantidad de mRNA de la TPH basal y estimulada por forskolín, sugieren que todos los efectos del cAMP sobre la TPH son postraduccionales.

Aunque no existe ningún trabajo sobre la regulación por cAMP de la actividad TPH de la retina, los escasos estudios *in vitro* realizados en cultivos de rebanadas de cerebro (Boadle-Biber, 1980; Nagatsu *et al.*, 1983) y en la glándula pineal (Shein y Wurtman, 1971; Sitaram y Lees, 1984; Ehret *et al.*, 1991) de mamíferos han encontrado que los proagonistas del cAMP estimulan la actividad TPH. Además, se ha descrito que el efecto estimulador del cAMP sobre el contenido de proteína de la TPH en la glándula pineal de aves es independiente de la fase del fotociclo (Florez y Takahasi, 1996b). Sin embargo, en pinealocitos aislados de esta misma especie, los niveles de mRNA de la TPH se modifican por cAMP únicamente cuando el incremento en los niveles de este segundo mensajero coincide con las 6 primeras horas de la fase luminosa (Green *et al.*, 1996). Nosotros hemos encontrado que en los fotorreceptores de *Xenopus laevis*, el efecto estimulador del cAMP sobre la actividad TPH no depende de la fase del fotociclo. Además, en *Xenopus laevis* los niveles de mRNA de la TPH no se modifican por el cAMP, excluyendo cualquier regulación transcripcional del gen de la TPH por el cAMP.

En 1991, Ehret y colaboradores encontraron que los efectos del cAMP sobre la actividad TPH de la glándula pineal de rata estaban mediados por un aumento en la síntesis *de novo* de la enzima, ya que la adición de actinomicina D o cicloheximida bloqueaba la estimulación de la actividad TPH provocada por los proagonistas de cAMP. Además, los datos de estos autores sugieren que el cAMP provoca un aumento en el número de moléculas de enzima ya que en presencia de los proagonistas de este segundo mensajero aumenta la velocidad máxima de la TPH pero no se modifican las características cinéticas de la enzima. Los datos obtenidos en esta memoria contrastan con los anteriormente mencionados. En los fotorreceptores de *Xenopus*



**Esquema 10:** Papel del cAMP en la regulación diaria de la síntesis de melatonina en los fotorreceptores retinianos de *Xenopus laevis*. efectos del cAMP sobre las actividades enzimáticas TPH y NAT. Las abreviaturas están explicadas en el texto.

*laevis*, ni la actinomicina D, ni la cicloheximida fueron capaces de bloquear el efecto estimulador del forskolin sobre la actividad enzimática, corroborando que, en esta especie y tejido, el cAMP está regulando la actividad TPH únicamente por mecanismos postraduccionales. Sin embargo, en pinealocitos aislados de pollo, se ha descrito que la regulación de la TPH parece implicar tanto mecanismos transcripcionales como postraduccionales (Florez y Takahashi, 1996b). Por tanto, el grado de participación de mecanismos pre- o postraduccionales parece depender del tejido y especie animal estudiada por lo que los escasos trabajos existentes no permiten establecer pautas generales, siendo necesaria la realización de más trabajos al respecto.

Entre los mecanismos postraduccionales de regulación por cAMP, uno de los más comunes es la fosforilación. Estudios *in vitro* realizados en homogeneizados de cerebro han demostrado que la TPH se fosforila y se activa por la PKA (Garber y Makman, 1987; Vrana *et al.*, 1994; Johansen *et al.*, 1996). Es más, estudios con quimeras moleculares demuestran que la PKA fosforila la TPH en la serina 58 (Johansen *et al.*, 1996; Kumer *et al.*, 1997). La secuencia del cDNA de la TPH de *Xenopus laevis* posee este residuo de serina conservado (Green y Besharse, 1994), por lo que es probable que la PKA sea capaz de fosforilar este residuo. Así mismo, Florez y Takahashi (1996b) demostraron que un aumento en los niveles de cAMP producía un aumento de la isoforma TPH<sub>p56</sub> y una disminución de la isoforma TPH<sub>6</sub> en pinealocitos aislados de pollo, reflejando un cambio en el estado de fosforilación de la TPH. Ehret y colaboradores (1991) también encontraron un aumento en el grado de fosforilación de las 3 isoformas de la TPH de la glándula pineal de rata después de la exposición al cAMP, aunque no fueron capaces de detectar aumentos diferenciales entre las distintas isoformas, ni cambios en los parámetros cinéticos de la TPH. Por tanto, parece que la fosforilación de la TPH por la PKA es un mecanismo general de regulación postraducciona

Al contrario de lo descrito para la actividad TPH, los estudios sobre la regulación de la actividad NAT retiniana son numerosos. Experimentos de cultivos de copas ópticas de anfibios, demuestran que los proagonistas del cAMP estimulan la actividad NAT (Iuvone y Besharse, 1986a; Alonso-Gómez, 1993) y la síntesis de melatonina (Alonso-Gómez, 1993), siendo estos efectos dependientes de la síntesis *de novo* de la enzima. Aunque estos resultados sugieren una regulación por cAMP de la transcripción del gen de la NAT, de momento no se disponen de datos moleculares que confirmen esta hipótesis en esta especie. Sin embargo, estudios recientes

demuestran que en los fotorreceptores aislados de pollo, el cAMP aumenta los niveles de mRNA de la NAT (Gréve *et al.*, 1997).

La existencia de un ritmo en el contenido intracelular de cAMP parece estar regulando las actividades TPH y NAT y la síntesis de melatonina en la retina. En la glándula pineal del pollo, se ha descrito un ritmo de dichos niveles paralelo al ritmo de liberación de melatonina (Nikaido y Takahashi, 1989). Es más, el contenido retiniano de cAMP en las distintas especies estudiadas es mayor en oscuridad que en luz (Orr *et al.*, 1976; Farber *et al.*, 1981; Burnside *et al.*, 1982; Cohen *et al.*, 1987). Esto concuerda con la mayor acumulación de cAMP en oscuridad que en luz encontrada por nosotros en los fotorreceptores de *Xenopus laevis*, permitiéndonos sugerir un modelo de cómo la regulación por cAMP está integrada en el ritmo diario de la síntesis de melatonina (Esquema 10). De este modo, el incremento nocturno en la síntesis de melatonina tendría al menos dos componentes. Por un lado, existiría un ritmo circadiano de la expresión génica de la TPH y la NAT, que es el responsable del aumento de la cantidad de enzima necesario para el incremento de la actividad enzimática nocturna. Si bien, el aumento en la síntesis *de novo*, parece ser suficiente para explicar el ritmo de actividad NAT, para la activación de la TPH se requiere un aumento en los niveles de cAMP que transforme la reserva de moléculas de enzima recién sintetizadas de una forma inactiva a una forma fosforilada más activa. En el caso de la NAT, el aumento en los niveles de cAMP provocaría una estimulación de la expresión génica que se sumaría a la expresión controlada por el oscilador endógeno, y además habría un aumento de la vida media de la NAT en el fotorreceptor debido a una estabilización de la enzima (Alonso-Gómez e Iuvone, 1995a). De este modo, los niveles finales de melatonina producida se deberían a una regulación coordinada de ambas actividades enzimáticas.

En esta memoria hemos encontrado que la activación de la TPH por cAMP requiere unos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular elevados, sugiriendo que la actividad AC implicada en la regulación de la actividad TPH en el fotorreceptor es una isoenzima dependiente del complejo calcio-calmodulina. Esta hipótesis se confirma en estudios previos en rebanadas de cerebro en cultivo, que demuestran que la estimulación de la actividad TPH cerebral también depende de la calmodulina (Boadle-Biber, 1982; Sawada y Nagatsu, 1986; Boadle-Biber y Phan, 1987). Hasta la fecha, se han descrito 3 isoenzimas de la AC que se activan por complejo calcio-calmodulina: I, III y VIII. Estudios de hibridación *in situ* han localizado la AC tipo I en las 3 capas nucleares

de la retina, siendo particularmente abundantes en los segmentos internos de los fotorreceptores (Xia *et al.*, 1993). Aunque también se ha detectado hibridación para la AC tipo III en la retina (Xia *et al.*, 1992), la señal para esta isoenzima es mucho menor que para la tipo I por lo que se cree que la isoenzima retiniana mayoritaria es la de tipo I. Estos datos concuerdan con los estudios bioquímicos realizados en fotorreceptores aislados de pollo que demuestran la presencia de la isoenzima tipo I (Alonso-Gómez e Iuvone, 1995; Iuvone y Alonso-Gómez, 1995). Además, estudios del mismo laboratorio, han demostrado que esta isoenzima está implicada en la regulación de la actividad NAT en el fotorreceptor (Avendano *et al.*, 1990; Gan *et al.*, 1995; Iuvone *et al.*, 1990).

En la célula, los niveles de cAMP se deben tanto a la regulación de su producción por la AC como a la de su degradación por las fosfodiesterasas (PDE). De forma similar a lo descrito previamente para la actividad NAT (Iuvone y Besharse, 1986a), en esta memoria hemos encontrado que la adición de un inhibidor general de las PDE, el IBMX, produce un aumento de la actividad TPH de la retina, confirmando el papel de estas enzimas en la regulación de la síntesis de melatonina. Es más, los datos obtenidos en esta memoria sugieren que la PDE implicada mayoritariamente en la regulación de los niveles de cAMP en el fotorreceptor es la isoenzima de tipo IV. Estos resultados concuerdan con estudios preliminares de nuestro laboratorio sobre la regulación de la actividad NAT de fotorreceptores aislados de pollo. En contraposición, no hemos encontrado ningún efecto de los inhibidores de la isoenzima de tipo I (enzima dependiente de calcio-calmodulina) sobre la actividad TPH. Por lo tanto, los niveles de cAMP en el fotorreceptor van a estar finamente regulados, tanto en su producción como en su degradación, procesos en los que el calcio va a jugar un papel central.

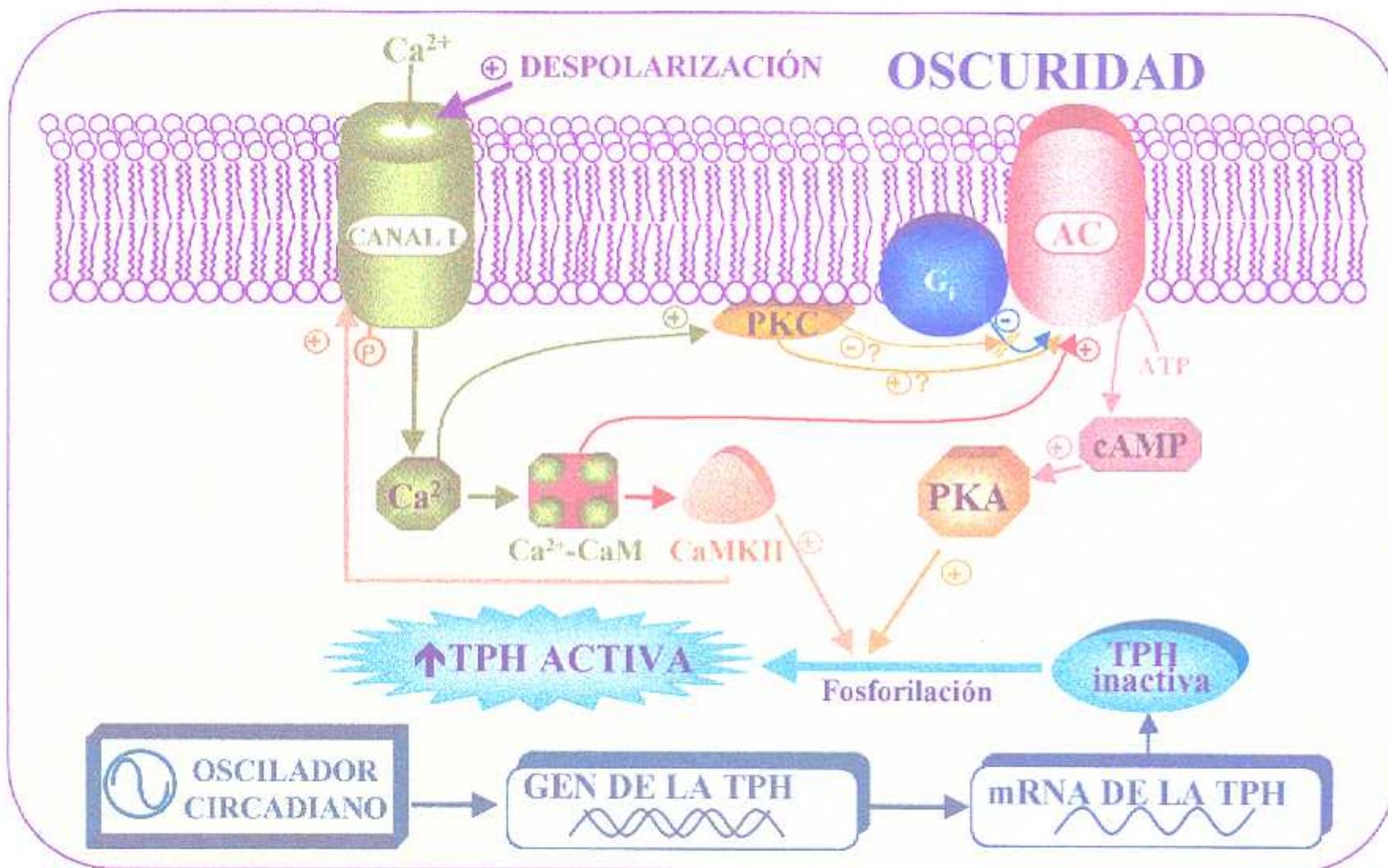
### 2.2.2. PAPEL DEL CALCIO

El papel del  $\text{Ca}^{2+}$  como regulador de la síntesis de melatonina de la glándula pineal (Zatz y Romero, 1978; Zhao y Touitou, 1993, 1994; Begay *et al.*, 1994) y de la retina (Iuvone y Besharse, 1986b; Avendano *et al.*, 1990; Alonso-Gómez, 1993) de varias especies de vertebrados ha sido previamente demostrado. La mayoría de estos estudios se limitan a determinar los cambios de la actividad NAT, siendo éste el primer trabajo que demuestra la importante función del  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulación de la actividad TPH de la retina.

En esta memoria hemos encontrado que el  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental para el mantenimiento de la actividad TPH del fotorreceptor, ya que la quelación de los niveles extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  con EGTA, no sólo impide el aumento de la actividad causado por la oscuridad, sino que también produce una disminución de la actividad basal en luz. En pinealocitos de pollo, el grado de fosforilación de la actividad TPH durante la noche también se reduce en presencia de un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque los niveles basales no se modifiquen (Florez y Takahashi, 1996b). Resultados similares se han obtenido para la actividad NAT de la retina de anfibios (Iuvone y Besharse, 1986b; Alonso-Gómez, 1993) y aves (Avendando *et al.*, 1990) confirmando el papel clave del  $\text{Ca}^{2+}$  en la biosíntesis de melatonina. Es importante señalar que se ha demostrado que el descenso en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por la concentración de EGTA (2 mM) utilizada en este trabajo no compromete la fisiología del fotorreceptor no modificando la transducción visual (Woodruff y Fain, 1982).

La intervención del  $\text{Ca}^{2+}$  en el aumento nocturno de la actividad TPH se confirma por el hecho de que la despolarización del fotorreceptor provocada con una concentración alta de KCl produce una estimulación de la actividad TPH equiparable a la oscuridad (Esquema 11). Este aumento de la actividad TPH cuando los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  son elevados se ha descrito también en estudios *in vitro* e *in situ* de cerebro (Boabder-Biber, 1980, Nagatsu *et al.*, 1983).

Al igual que en el resto de los vertebrados, los fotorreceptores de anfibios poseen canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Fain *et al.*, 1980; Corey *et al.*, 1984). Estos canales están abiertos en oscuridad y cerrados en luz. Además, su conductancia no parece decaer con el tiempo, es decir no se inactiva (Corey *et al.*, 1984), por lo que podrían mantenerse tónicamente abiertos en oscuridad. En esta memoria se demuestra que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L están implicados en la regulación de la actividad TPH (Esquema 11). La adición del agonista, Bay K8644, produce un aumento paralelo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el fotorreceptor y de la actividad TPH. La especificidad de dicho efecto queda demostrada por el hecho de que un antagonista de este tipo de canales, el nifedipino, bloquea ambos efectos. De hecho, la adición de un antagonista de los canales de tipo N,  $\omega$ -conotoxina, no fue capaz de bloquear el incremento nocturno de actividad TPH. Estos resultados son paralelos a los obtenidos cuando se valora la actividad NAT. En todos los vertebrados estudiados, el bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L del fotorreceptor impide el incremento nocturno de actividad NAT (Iuvone y Besharse, 1986b;



**Esquema 11:** Papel del calcio en la regulación diaria de la actividad TPH de los fotorreceptores retinianos de *Xenopus laevis*. Las abreviaturas están explicadas en el texto.

Avendano *et al.*, 1990), sugiriendo de nuevo la participación coordinada de ambas enzimas (NAT y TPH) en la regulación de la síntesis de melatonina.

La elevación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  del fotorreceptor va a producir la activación de distintas vías de transmisión, entre las que se encuentra la activación de una calciproteína, la calmodulina. En esta memoria hemos demostrado que la activación del complejo calcio-calmodulina es indispensable para que se produzca la estimulación por  $\text{Ca}^{2+}$  de la actividad TPH en los fotorreceptores de *Xenopus laevis*. Es más, entre las múltiples proteínas quinasas que pueden ser a su vez activadas por el complejo calcio-calmodulina, la CaMKII parece jugar un papel fundamental en la regulación de la actividad TPH, como lo demuestra el hecho de la estimulación de la actividad TPH inducida por Bay K8644 se bloqueó en presencia de los inhibidores de dicha proteína quinasa. Es importante señalar que los inhibidores utilizados en esta parte del trabajo, CGS 9343B, KN-93 y KT5926 son altamente específicos para las proteínas estudiadas no habiéndose descrito interacciones de los mismos con otras vías de comunicación intracelular. Es más, el KN-93 y el KT5926 aunque son ambos inhibidores de la CaMKII, fueron elegidos debido a que su modo de acción es distinto, el KT5926 es un inhibidor competitivo del sustrato de la quinasa, el ATP (Hashimoto *et al.*, 1991), mientras que el KN-93 inhibe la CaMKII impidiendo que pueda ser activada por el complejo calcio-calmodulina (Sumi *et al.*, 1991).

Existen distintas posibilidades por las que la CaMKII podría activar a la TPH. La hipótesis más probable apunta que la CaMKII podría fosforilar directamente la TPH. En la secuencia de aminoácidos de la TPH descrita para todos los vertebrados estudiados hasta la fecha (Grennet *et al.*, 1987; Darmon *et al.*, 1988; Stoll *et al.*, 1990; Boularand *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1991; Tipper *et al.*, 1994; Florez *et al.*, 1996), incluido *Xenopus laevis* (Green y Besharse, 1994), existen dos residuos de serina conservados (Ser 260 y Ser 443) que son posibles sitios de fosforilación por la CaMKII (Darmon *et al.*, 1988). De hecho, Ehret y colaboradores en 1989 demostraron que la CaMKII fosforila la TPH del cerebro de rata. Sin embargo, no se puede descartar otras acciones indirectas de la CaMKII como la fosforilación de otra u otras proteínas quinasas que a su vez fosforilen la TPH. Además, en fotorreceptores aislados de pollo se ha demostrado que los inhibidores de la CaMKII bloquean tanto la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Alonso-Gómez *et al.*, 1996) como el aumento del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provocado por condiciones despolarizantes (Uchida e Iuvone, 1997). Estos datos sugieren un mecanismo de fosforilación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por

la CaMKII que, al igual que el Bay K8644, aumentaría el tiempo de apertura del canal que había sido previamente activado por despolarización (Nowycky *et al.*, 1985). De este modo, una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inicial daría lugar a una respuesta sostenida y que no se inactivaría con el tiempo. Por tanto, la CaMKII podría estar implicada en la regulación de la actividad TPH a varios niveles, una activación directa de la TPH, y una potenciación y mantenimiento de los niveles de calcio intracelulares mediante la activación los canales de tipo L.

Como hemos mencionado en el apartado anterior, la actividad AC presente en el fotorreceptor es mayoritariamente una isoenzima dependiente del complejo calcio-calmodulina, por tanto, una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular conllevaría una elevación paralela de los niveles de cAMP del fotorreceptor. De este modo, los efectos del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el fotorreceptor sobre la actividad TPH podrían deberse, en último término y como ya hemos discutido en el apartado 2.2.1 de la discusión, a la fosforilación y activación de la enzima por la PKA. Los datos obtenidos en esta memoria apoyan esta hipótesis, confirmando la existencia de una interacción entre ambas vías de comunicación intracelular. Pero, si bien el efecto regulador del cAMP sobre la actividad TPH requiere un aumento previo de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  ejerce parte de sus efectos reguladores por mecanismos independientes del cAMP, como lo demuestra el hecho de que la adición conjunta de Bay K8644 y forskolin produzca una sobreestimulación de la actividad TPH y que los efectos estimuladores del Bay K8644 sólo sean reducidos en un 40% por los inhibidores de la PKA. La existencia de mecanismos reguladores del  $\text{Ca}^{2+}$  independientes del cAMP también se ha demostrado para la actividad TPH de cerebro donde se ha encontrado un efecto sinérgico del ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  (A-23187) y el dibutilil-cAMP (Nagatsu *et al.*, 1983).

En los fotorreceptores de aves, se ha demostrado que tras la despolarización, el aumento del contenido intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  produce una activación de la fosfolipasa C (Gan e Iuvone, 1997) que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol, provocando la activación de la PKC. En esta memoria hemos demostrado la participación de la PKC en la regulación positiva de la actividad TPH. Es más, nuestros resultados sugieren que en los fotorreceptores de *Xenopus laevis*, los efectos de la PKC sobre la actividad TPH no son directos sino que se ejercen a través del cAMP. Aunque no hemos encontrado ningún trabajo que determine un efecto regulador directo de la PKC sobre la AC de los fotorreceptores de anfibios, estudios realizados en pollo demuestran que los inhibidores de la PKC disminuyen la acumulación

de cAMP, mientras que los ésteres de forbol potencian la actividad AC en células permeabilizadas (Iuvone *et al.*, 1996). Estudios *in vitro* realizados en homogeneizados de cerebro demuestran que la AC tipo I se estimula por activadores de la PKC como los ésteres de forbol (Jacobowitz *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 1993). Es más, en los fotorreceptores aislados de pollo se ha demostrado que la PKC interviene en la regulación de la actividad NAT potenciando la respuesta de la AC al  $\text{Ca}^{2+}$  (Iuvone *et al.*, 1996). Entre las múltiples isoenzimas de la PKC descritas, las isoenzimas  $\alpha$  y  $\zeta$  suelen colocalizarse en los fotorreceptores (Fukuda *et al.*, 1994). Sin embargo, en la mayoría de las especies de vertebrados, únicamente se localiza en el segmento interno la isoenzima  $\zeta$  (Ghalayini *et al.*, 1994; Osborne *et al.*, 1994), con excepción del pollo donde también se localizan las isoenzimas  $\xi$  y  $\delta$  (Osborne *et al.*, 1994). Concretamente, en anfibios anuros, únicamente se ha localizado la presencia de las isoformas  $\zeta$  y  $\delta$ , siendo la  $\zeta$  la isoenzima presente en los fotorreceptores (Terasawa *et al.*, 1991).

Aunque todas las vías de transmisión de la señal dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , discutidas hasta el momento y que parecen activarse tras la despolarización del fotorreceptor, utilizan mecanismos reguladores postraduccionales como la fosforilación, a priori no podemos descartar que el aumento del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  esté también estimulando procesos de activación génica. Sin embargo, al igual que lo discutido previamente para el cAMP, en los fotorreceptores de *Xenopus laevis* un aumento del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular no modifica el contenido de mRNA de la TPH permitiendo eliminar cualquier mecanismo de regulación génica. Es más, el efecto estimulador del Bay K8644 sobre la actividad enzimática no se ve modificado por la presencia de cicloheximida en el medio, confirmando que los mecanismos de regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  parecen ser únicamente postraduccionales. Estudios bioquímicos en homogeneizados de cerebro de rata han demostrado que un aumento del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provoca un cambio en las características cinéticas de la TPH confirmando la intervención de mecanismos de regulación postraduccionales (Boabder-Biber, 1980).

Los resultados obtenidos en esta parte de la memoria junto con los hallados en el estudio del papel del cAMP y el fotoperiodo nos permiten sugerir un modelo de la regulación diaria de la actividad TPH de los fotorreceptores de *Xenopus laevis* (Esquema 11). De este modo, el ritmo circadiano de la expresión génica de la TPH y la NAT, responsable del aumento en la cantidad de enzima necesaria para el incremento en la actividad enzimática nocturna, se vería potenciado

y ampliado por los mecanismos postraduccionales disparados por la oscuridad. La oscuridad despolariza el fotorreceptor provocando la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje de tipo L. La entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentaría los niveles del complejo calcio-calmodulina. Este complejo, por un lado activaría la AC tipo I provocando un aumento del contenido intracelular de cAMP y una activación de la PKA que fosforilaría la TPH transformando las moléculas de enzima recién sintetizadas en una forma biológicamente más activa. Por otro lado, el complejo calcio-calmodulina activaría la CaMKII. Esta proteína quinasa realizaría dos funciones fundamentales: la fosforilación y consiguiente activación de la actividad TPH, y la fosforilación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L del fotorreceptor permitiendo la elevación sostenida de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  necesarios para que no se produzca la terminación de la respuesta, mientras siga manteniéndose la oscuridad. Además, los niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  provocarían una activación de la PKC que estaría potenciando la respuesta del cAMP promovida por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Aunque estas acciones son las que se extraen de nuestros datos, no se pueden descartar otras acciones indirectas del  $\text{Ca}^{2+}$  o del complejo calcio-calmodulina en la regulación de la actividad TPH. Así mismo, todos estos cambios estarían también estimulando la síntesis *de novo* y estabilizando la actividad NAT (Alonso-Gómez e Iuvone, 1995a) por lo que la producción de melatonina total depende de la regulación coordinada de ambas enzimas (Esquema 10).

### 2.2.3. PAPEL DEL cGMP.

Los estudios existentes hasta la fecha sobre la intervención del cGMP en la biosíntesis de melatonina son escasos y en ocasiones contradictorios. Los primeros estudios realizados en pinealocitos de pollo adulto proponían al cGMP como un estimulador de la liberación de melatonina (Wainwright y Wainwright, 1984a y b). Sin embargo, los fármacos utilizados en estos estudios no eran selectivos para el sistema del cGMP, por lo que los resultados obtenidos podrían deberse a la intervención del sistema del cAMP. Estudios posteriores, han demostrado que el cGMP no parece intervenir en la regulación de la actividad NAT (Thibault *et al.*, 1993) ni en la liberación de melatonina (Zatz y Mullen 1988) de la glándula pineal de aves y mamíferos.

Los estudios realizados en la retina también muestran resultados diversos. Experimentos realizados en fotorreceptores aislados en cultivo y en retinas adultas de pollo sugieren que el cGMP está regulando positivamente la actividad NAT (Iuvone *et al.*, 1990; Nowak *et al.*, 1990; Nowak y Wawrocka, 1993). Sin embargo, en cultivos de copas ópticas de *Xenopus laevis* no se

encuentra efecto de los análogos del cGMP sobre la actividad NAT (Iuvone y Besharse, 1983, 1986a).

Este es el primer trabajo acerca del efecto del cGMP sobre la actividad TPH. En esta memoria hemos encontrado que, en los fotorreceptores retinianos de *Xenopus laevis*, los análogos del cGMP y los inhibidores de las PDE de tipo V y VI incrementan la actividad TPH indicando la participación del cGMP en la regulación de dicha enzima. Aunque los fármacos utilizados en esta memoria estimulan la actividad TPH, existen pequeñas diferencias en los resultados obtenidos. La adición del dibutilil-cGMP, análogo que no se une a los canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos pero que activa directamente la PKG, únicamente fue capaz de estimular la actividad enzimática cuando el cultivo se realizó en oscuridad. Por tanto, los efectos observados tras el uso de este fármaco se deberían principalmente a fenómenos de fosforilación desencadenados por la PKG, aunque hasta el momento no se ha descrito la fosforilación directa de la TPH por la PKG. En el fotorreceptor, la PDE-VI que está acoplada a la rodopsina (Esquema 12), se encontraría activa en luz inactivándose con la oscuridad (Pfister *et al.*, 1993). Estas diferencias de actividad dependiendo de las condiciones de iluminación explicaría porqué la adición de MBCQ sólo es capaz de activar la TPH en luz, ya que únicamente cuando las PDE están activas, su inhibición sería capaz de aumentar los niveles intracelulares de cGMP.

En esta memoria, hemos encontrado que el nifedipino bloquea el efecto estimulador de los inhibidores de las PDE-V/VI, sugiriendo que los efectos del cGMP sobre la actividad TPH no son directos, sino que requieren de la entrada de  $Ca^{2+}$  en el fotorreceptor (Esquema 12). En los fotorreceptores de todos los vertebrados estudiados, incluidos los anfibios (Kilbride y Ebret, 1979; Woodruff y Bownds, 1979; Woodruff y Fain, 1982), se ha demostrado que los niveles de cGMP son altos en oscuridad y que por acción de la luz el cGMP se hidroliza. Es más, en el segmento interno de los anfibios se ha detectado la presencia de canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (Watanabe y Matthews, 1988). La unión del cGMP a estos canales provoca su apertura y el intercambio de cationes induce la despolarización del fotorreceptor (Matthews y Watanabe, 1988; Yau y Baylor, 1989) con la consiguiente apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Por tanto, una elevación de los niveles intracelulares de cGMP, como la que se produce en oscuridad, conduciría a un aumento del contenido intracelular de  $Ca^{2+}$ . Esta elevación de los niveles de  $Ca^{2+}$  sería, en último término, la responsable de la activación de la

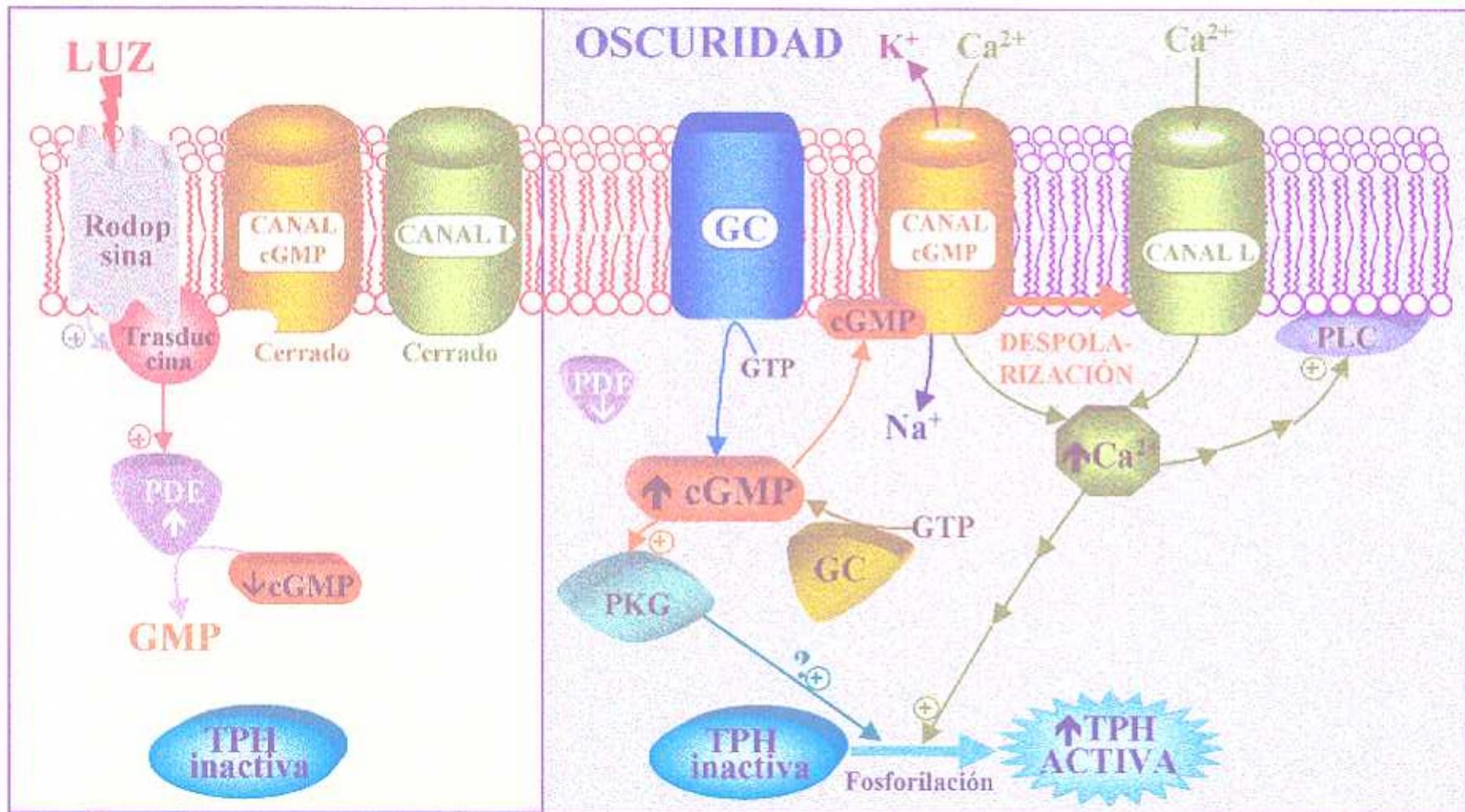


Figura 12: Papel del cGMP en la regulación de la actividad TPH en los fotorreceptores retinianos de *Xenopus laevis*. Las abreviaturas están explicadas en el texto.

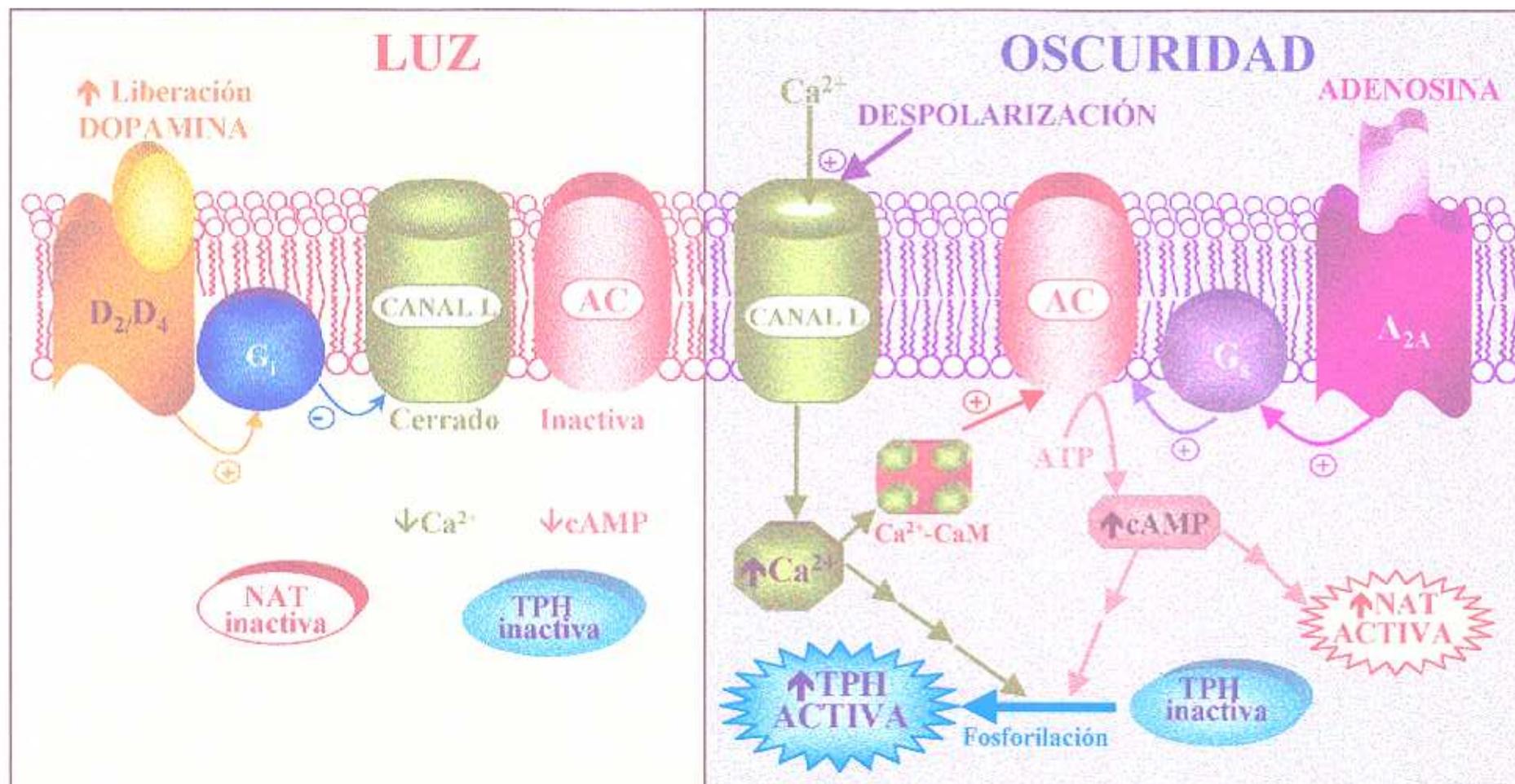
actividad TPH por los mecanismos discutidos anteriormente (Esquema 11). Estudios en cultivos de fotorreceptores aislados de pollo demuestran que la adición de un análogo no hidrolizable del cGMP aumenta el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la hidrólisis de fosfoinositoles (Haque *et al.*, 1998), así como que la elevación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el cGMP se debe en igual medida a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por el propio canal iónico activado por nucleótidos cíclicos y por el canal de tipo L.

### **2.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA POR NEUROMODULADORES RETINIANOS.**

#### **2.3.1. PAPEL DE LA DOPAMINA EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TPH**

Aunque el papel de la dopamina como regulador de la síntesis de melatonina en la retina ha sido ampliamente estudiado, no hemos encontrado ningún trabajo acerca del efecto de la dopamina sobre la actividad TPH. Esta memoria es, por tanto, el primer estudio acerca del papel regulador de la dopamina sobre la actividad TPH de los fotorreceptores (Esquema 13). En los fotorreceptores de *Xenopus laevis* la dopamina está regulando negativamente la actividad TPH a través de receptores de la familia  $D_2$ . Es más, el agonista  $D_2$ , quimpirol, bloquea la estimulación de la actividad TPH provocada por el forskolin y el Bay K8644. Estos resultados, sugieren que la interacción de la dopamina con su receptor influye tanto en el sistema del  $\text{Ca}^{2+}$  como del cAMP, provocando una disminución del contenido intracelular de ambos segundos mensajeros e inhibiendo las cascadas de fosforilación que conducen a la activación de la TPH. Es más, estudios previos no encontraron ningún efecto de los agonistas y antagonistas  $D_2$  sobre los niveles de mRNA de la TPH de la retina de *Xenopus laevis* (Green *et al.*, 1995a), permitiendo descartar cualquier regulación transcripcional del gen de la TPH por la dopamina.

En los fotorreceptores de *Xenopus laevis*, la unión de los agonistas dopaminérgicos  $D_2$  a su receptor provoca una disminución muy marcada de la entrada  $\text{Ca}^{2+}$  similar a la observada en presencia de nifedipino. El mismo efecto se ha encontrado en cultivos de fotorreceptores aislados de pollo y salamandras. En estas especies y en condiciones despolarizantes, la dopamina impide la entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  a través de canales sensibles a dihidropiridinas del fotorreceptor, siendo los efectos de la dopamina y los agonistas  $D_2$  bloqueados por antagonistas  $D_2$  o por la toxina *pertussis* (Grant y Werblin, 1990; Alonso-Gómez *et al.*, 1996; Iuvone y Alonso-Gómez, 1997a).



Esquema 13: Papel de la adenosina y la dopamina en la regulación por la luz de la síntesis de melatonina: efectos sobre las actividades enzimáticas TPH y NAT. Las abreviaturas están explicadas en el texto.

Además, estudios de "path-clamp" con segmentos internos de bastones de *Xenopus laevis* concluyen que la dopamina y los agonistas D<sub>2</sub> modulan la corriente activada por hiperpolarización mediante la activación de una proteína G en un proceso en el que interviene el Ca<sup>2+</sup> pero no el cAMP (Akopian y Witkovsky, 1996). Estos datos sugieren un modelo donde la dopamina interacciona con su receptor, y a través de una proteína G, posiblemente de la familia G<sub>o</sub>, cierra los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje de tipo L produciendo una disminución de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular.

Como ya hemos comentado, la AC presente en el segmento interno del fotorreceptor es una isoenzima dependiente del complejo calcio-calmodulina. Por tanto, el descenso de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelulares provocado por la interacción del receptor de dopamina con el canal de Ca<sup>2+</sup> de tipo L inactivaría la AC reduciéndose los niveles de cAMP. Numerosas observaciones apoyan esta hipótesis. En la retina de aves y mamíferos, la activación de los receptores de dopamina disminuye la formación de cAMP (Cohen y Blazynski, 1990; Iuvone *et al.*, 1990; Zawilska *et al.*, 1995) pero no parece existir un acoplamiento directo del receptor de dopamina a la AC (Sitaramayya *et al.*, 1993; Zawilska *et al.*, 1995). Es más, nosotros hemos encontrado que en los fotorreceptores de *Xenopus laevis*, el quimpirol y el nifedipino producen una inhibición idéntica en la acumulación de cAMP estimulada por forskolin, sugiriendo que ambos fármacos están actuando en la misma vía y en un lugar anterior a la AC.

Los datos obtenidos por nosotros sobre el papel de la dopamina en la regulación de la actividad TPH también coinciden con los datos actuales de los efectos de la dopamina en la biosíntesis de melatonina. La síntesis y liberación de dopamina en la retina de vertebrados se estimula por la luz (Iuvone *et al.*, 1978; Pakinson y Rando, 1983; Godley y Wurtman, 1988; Boatright *et al.*, 1989; Kirsch y Wagner, 1989). La dopamina inhibe el incremento nocturno de la actividad NAT (Iuvone y Besharse, 1986c; Zawilska e Iuvone, 1989; Iuvone *et al.*, 1990) y la liberación de melatonina retiniana (Cahill y Besharse, 1991, 1993; Nguyen-Legros *et al.*, 1996), mimetizando los efectos de la luz. Estos efectos parecen estar mediados por receptores con una farmacología típica de la familia D<sub>2</sub> (Iuvone *et al.*, 1987; Zawilska e Iuvone, 1989; Iuvone *et al.*, 1990; Alonso-Gómez, 1993; Nguyen-Legros *et al.*, 1996). Además, en los fotorreceptores de aves, los efectos inhibitorios de la dopamina sobre la actividad NAT van acompañados de una disminución en la acumulación de cAMP del fotorreceptor (Iuvone *et al.*, 1990).

Los resultados expuestos sugieren la siguiente hipótesis de cómo la dopamina interviene en la regulación de la síntesis de melatonina (Esquema 13). La dopamina liberada durante el día se une a receptores con una farmacología típica  $D_2$  situados en la superficie de los fotorreceptores, y a través de una proteína  $G_{\text{of}}$  provoca el cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. La caída en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular conduce a la inactivación de la AC y a la disminución del contenido de cAMP del fotorreceptor. Los bajos niveles intracelulares de ambos segundos mensajeros producirían la reducción de las actividades TPH y NAT (Iuvone *et al.*, 1990) y por tanto, la liberación de melatonina. De este modo, los bajos niveles de melatonina diurnos se deberían, no sólo a un efecto inhibitor directo de la luz, sino también a los efectos mediados por la dopamina.

### 2.3.2. PAPEL DE LA ADENOSINA EN LA SÍNTESIS DE MELATONINA

Al igual que la dopamina interviene en la regulación de la síntesis de melatonina potenciando el efecto inhibitor de la luz, podría esperarse que otros neurotransmisores intervinieran potenciando los efectos promovidos por la oscuridad. Los receptores de dicho neurotransmisor, por tanto, deberían estar acoplados a una proteína  $G_s$  siendo capaz, o bien de estimular la AC, o bien de favorecer la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. En el segmento interno de los fotorreceptores se han localizado receptores  $A_2$  (Blazynski, 1990 y 1993; Blazynski y McIntosh, 1993). Estos receptores están acoplados positivamente a la AC (Dalziel y Wesfall, 1994) por lo que la adenosina podrían ser un buen candidato para dicha función. Además, se ha demostrado que los fotorreceptores de pollo (Paes de Carvalho, 1990) liberan adenosina en condiciones despolarizantes y por tanto, podría estar actuando como un agente autocrino.

En esta memoria hemos encontrado que cualquier tratamiento que aumente el contenido de adenosina extracelular estimula las actividades TPH y NAT presentes en los fotorreceptores. Igualmente, la eliminación de la adenosina extracelular provoca una reducción de las actividades TPH y NAT, demostrando que la adenosina endógena interviene en la regulación de la síntesis de melatonina. Los datos obtenidos en este trabajo también permiten afirmar que en la retina de *Xenopus laevis* la adenosina regula positivamente la actividades NAT y TPH presentes en los fotorreceptores a través de receptores  $A_2$ , concretamente se trata de un receptor con una farmacología típica del subtipo  $A_{2A}$ , como lo demuestra el hecho de que únicamente los agonistas

de dichos receptores fueran capaces de estimular las actividades enzimáticas. Sin embargo, no hemos encontrado ningún efecto de la adenosina endógena, ni de los fármacos selectivos para receptores  $A_1$  y  $A_2$  sobre la actividad TPH de las retinas intactas, permitiendo descartar cualquier efecto de la adenosina en la regulación de la síntesis de serotonina en las neuronas serotoninérgicas.

Aunque, en la retina, no existe ningún otro estudio al respecto, los experimentos realizados en la glándula pineal de varias especies encuentran una intervención de la adenosina en la regulación de la síntesis de melatonina, aunque en ocasiones estos resultados sean contradictorios. De este modo, en la pineal de rata se encontró que la adenosina y sus agonistas elevaban el contenido de N-acetilserotonina y melatonina a través de receptores  $A_2$  (Gharbin *et al.*, 1989 y Babey *et al.*, 1994). Sin embargo, Nordio y colaboradores (1992) no fueron capaces de detectar ningún efecto de la adenosina sobre la actividad NAT y el contenido y liberación de melatonina de la glándula pineal de la misma especie. La posible existencia de receptores  $A_1$  y  $A_2$  en la glándula pineal, así como el uso de agonistas inespecíficos podría dificultar la interpretación de los resultados de estos trabajos. De este modo, en la glándula pineal de teleosteos (Falcón *et al.*, 1991) y de pollo (Falcón *et al.*, 1988), la adición del agonista no selectivo 2-cloroadenosina da lugar a unos resultados que dependen de la forma de como se hizo el experimento. Cuando se administró solo, no tuvo ningún efecto sobre la actividad NAT, pero estimuló la actividad enzimática cuando se coadministró con el inhibidor de la recaptura de adenosina NBTI. Esto podría sugerir la participación de los receptores  $A_2$ . Sin embargo en estos mismos trabajos, la 2-cloroadenosina o un agonista específico  $A_1$  (CHA) bloquearon el efecto estimulador del forskolin sobre la actividad NAT y la liberación de melatonina, indicando también una intervención de los receptores  $A_1$ . Por tanto, en la glándula pineal, al contrario que en la retina, la adenosina parece ejercer sus funciones reguladoras sobre la síntesis de melatonina actuando a través de ambos subtipos de receptores:  $A_1$  y  $A_2$ . De este modo, se hace necesaria la realización de más trabajos que estudien la localización celular de cada uno de estos receptores en la glándula pineal, así como de su función, utilizando fármacos más selectivos.

Respecto a los mecanismos de transmisión de la señal acoplados a la interacción de la adenosina con su receptor, en esta memoria hemos encontrado que el efecto estimulador de los agonistas  $A_2$  desaparece en presencia del inhibidor de la PKA, H89, y del bloqueante de los

canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, nifedipino. Estos resultados sugieren que, en los fotorreceptores retinianos de *Xenopus laevis*, la unión de la adenosina al receptor  $A_2$  produce una activación del sistema del cAMP y que dicha activación parece ser dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como ya hemos mencionado anteriormente, está ampliamente demostrado que los receptores  $A_2$ , en la mayoría de las células, están acoplados positivamente a la AC (Dalziel y Wesfall, 1994), incluidas las células de la retina (Paes de Carvalho y De Mello, 1982; Schorderet, 1982). Por tanto, parece bastante probable que en los fotorreceptores la interacción de la adenosina con el receptor  $A_2$  provoque una activación de la AC, un aumento del contenido de cAMP intracelular y en último término una estimulación de las actividades TPH y NAT. Debido a que la actividad AC mayoritaria en el fotorreceptor es la isoenzima de tipo I, para que el receptor  $A_2$  pueda estimular a la AC se requiere que el complejo calcio-calmodulina se encuentre unido a esta enzima, como lo demuestra el hecho de que el nifedipino bloqueó el efecto estimulador del CPCA.

Esta hipótesis, se ajusta en nuestro modelo de la regulación diaria de la actividad NAT y la síntesis de melatonina en los fotorreceptores de *Xenopus laevis* (Esquema 13). La oscuridad despolariza el fotorreceptor e inhibe la liberación de dopamina. Los fotorreceptores activados por la oscuridad, por un lado, liberan adenosina de una manera dependiente de potasio (Paes de Carvalho, 1990). Por otro, la oscuridad abre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, produciendo una elevación del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y del complejo calcio-calmodulina que permite la activación de la AC. La adenosina liberada durante la oscuridad, se une a los receptores  $A_2$  que se acoplan positivamente a la AC sobreestimando la producción de cAMP. De este modo, el elevado contenido nocturno de las actividades TPH y NAT y de la liberación de melatonina se debería a la actuación simultánea de ambos factores: un efecto directo de la oscuridad despolarizando el fotorreceptor y abriendo los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y la unión de la adenosina a los receptores  $A_2$  potenciando la respuesta del fotorreceptor a la oscuridad.

## **VI. CONCLUSIONES**

La inyección intraocular de ácido kaínico en dosis comprendidas entre 50-300 nmol/ojo es un método adecuado para la obtención de retinas de *Xenopus laevis* enriquecidas en fotorreceptores. A dichas dosis, las acciones neurotóxicas del ácido kaínico provocan una extensa muerte celular que afecta a la mayoría de los tipos neuronales de la retina, incluyendo las neuronas serotoninérgicas. Sin embargo, el ácido kaínico no afecta a los fotorreceptores, que siguen mostrando su morfología y fotosensibilidad características.

La utilización del inhibidor de la AAAD, mHBH, es una herramienta farmacológica útil para la determinación de la actividad TPH retiniana de *Xenopus laevis*. La inyección intraperitoneal de este compuesto permite valorar la actividad enzimática *in vivo*, mientras que su adición al medio de cultivo permite determinar la actividad TPH *in situ*, reflejándose, en ambos métodos, el funcionamiento de la enzima en condiciones fisiológicas.

En la retina de *Xenopus laevis*, la actividad TPH muestra un ritmo diario cuyos niveles y perfiles son diferentes en las retinas intactas y lesionadas con ácido kaínico, indicando que la actividad enzimática se regula por la luz de forma distinta en los fotorreceptores y en las neuronas serotoninérgicas. El ritmo de actividad TPH en los fotorreceptores de *Xenopus laevis* es paralelo a los ritmos de actividad NAT y melatonina ocular, previamente descritos por otros autores en esta misma especie, indicando que la actividad TPH interviene de forma activa y coordinada con la actividad NAT en la regulación de la biosíntesis de melatonina.

El ciclo luz-oscuridad dirige los principales sistemas de comunicación intracelular de los fotorreceptores retinianos de *Xenopus laevis*. Un aumento de los niveles intracelulares de cGMP mimetiza los efectos de la oscuridad, provocando una despolarización del fotorreceptor y una apertura de los canales de calcio de tipo L. Así mismo, nuestros datos sugieren que otras acciones del cGMP, como la activación de la PKG y las consiguientes cascadas de fosforilación desencadenadas por esta proteína quinasa, podrían estar interviniendo en la regulación de la actividad TPH del fotorreceptor.

La entrada de calcio a través de los canales sensibles a dihidropiridinas desencadena una serie de procesos dependientes del complejo calcio-calmodulina, como una estimulación de la CaMKII y de la adenilato ciclasa tipo I. La inhibición de la CaMKII provoca una marcada

reducción de la actividad TPH. Este resultado confirma los datos moleculares y bioquímicos que proponen que esta proteína quinasa fosforila directamente la TPH, activándola.

La activación de la adenilato ciclasa de tipo I, bien por una elevación del contenido de calcio intracelular, o bien por el uso de activadores específicos de esta enzima, provoca un aumento del contenido de cAMP intracelular en los fotorreceptores de *Xenopus laevis*. Esta elevación de los niveles de cAMP estimula notablemente la actividad TPH por un proceso que es dependiente de la PKA. La TPH tiene un lugar de fosforilación específico para la PKA, cuya fosforilación conlleva a un aumento de su actividad enzimática.

La entrada de calcio en el fotorreceptor también provoca una activación de la PKC. La activación de esta proteína quinasa desencadena una serie de procesos que conducen a una estimulación de la actividad TPH. Entre los pasos intermedios que conducen a la activación de la TPH por la PKC se encuentran el aumento en el contenido de cAMP intracelular y la fosforilación de la TPH por la PKA.

La fosforilación de la TPH por la CaMKII y la PKA propuesta anteriormente se confirma por el hecho de que en la regulación de la actividad TPH por calcio y cAMP únicamente parecen intervenir mecanismos postraduccionales. De este modo, el contenido de mRNA de la TPH no se modificó por ninguno de los tratamientos farmacológicos realizados en esta memoria. Así mismo, la estimulación de la actividad TPH inducida por un aumento del contenido de calcio y cAMP intracelulares se mantuvo en presencia del inhibidor de la traducción, cicloheximida.

La dopamina regula negativamente la actividad TPH presente en los fotorreceptores retinianos de *Xenopus laevis*, mimetizando el efecto de la luz. El uso de agonistas y antagonistas específicos demuestra que los efectos de la dopamina se ejercen a través de receptores con una farmacología típica de la familia D<sub>2</sub>. La interacción de los agonistas dopaminérgicos con su receptor cierra los canales de calcio sensibles a dihidropiridinas, provocando una disminución del calcio y del cAMP intracelulares. La caída en los niveles de ambos segundos mensajeros es la responsable de la reducción de la actividad TPH provocada por la dopamina.

Los niveles extracelulares de la adenosina intervienen en la regulación de la síntesis de melatonina, regulando positivamente las actividades TPH y NAT de los fotorreceptores retinianos de *Xenopus laevis*. El uso de agonistas y antagonistas específicos demuestra que la adenosina estimula las actividades TPH y NAT a través de receptores con una farmacología típica  $A_2$ , concretamente del subtipo  $A_{2A}$ . Los efectos estimuladores de la adenosina sobre las actividades enzimáticas mimetizan el efecto de la oscuridad y requieren unos niveles de calcio intracelular elevados. Además, la PKA interviene en los efectos estimuladores de la adenosina sobre las actividades TPH y NAT, como lo demuestran los resultados obtenidos en los experimentos con su inhibidor H89.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- Adachi A., Hasegawa M. y Ebihara S. (1995). Measurement of circadian rhythms of ocular melatonin in the pigeon by in vivo microdialysis. *Neuroreport* 7:286-288.
- Adler R., Lindsey J.D. y Elsner C.L. (1984). Expression of cone-like properties by chick embryo neural retina cells in glial-free monolayer cultures. *J. Cell. Biol.* 99:1173-1178.
- Adolph A.R. y Zucker C.L. (1988). Exclusive localization of somatostatin-containing amacrine cells within the turtle visual streak. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29:196.
- Agui T., Chase T.N. y Keibarian J.W. (1988). Identification of D<sub>1</sub>-dopamine receptor in chicken embryo retina with [<sup>125</sup>I]SCH 23982. *Brain Res.* 452:49-56.
- Aizanman E., Frosch M.P. y Lipton S.A. (1988). Response mediated by excitatory amino acid receptors in solitary retinal ganglion cells from rat. *J. Physiol.* 396:75-91.
- Akopian A. y Witkovsky P. (1996). D<sub>2</sub> dopamine receptor-mediated inhibition of a hyperpolarization-activated current in rod photoreceptors. *J. Neurophysiol.* 76:1828-1835.
- Albers R.W. y Brady R.O. (1959). The distribution of glutamic acid decarboxylase in the nervous system of the rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* 234:926-928.
- Alonso-Gómez A.L. (1993). Función de la arilalquilamina N-acetiltransferasa en la regulación en la síntesis rítmica de melatonina en la retina de anfibios anuros: influencia de factores ambientales y endógenos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Alonso-Gómez A.L. y Iuvone P.M. (1995a). Melatonin biosynthesis in cultured chick retinal photoreceptor cells: calcium y cyclic AMP protect serotonin N-acetyltransferase from inactivation in cycloheximide-treated cells. *J. Neurochem.* 65:1054-1060.
- Alonso-Gómez A.L. y Iuvone P.M. (1995b). Role of calmodulin in the regulation of serotonin N-acetyltransferase activity in cultured chick retinal photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 36:S512.
- Alonso-Gómez A.L., Valenciano A.I. y Iuvone P.M. (1996). Dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels in photoreceptor-enriched cell cultures: regulation by dopamine receptors and intracellular signals. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:S140.

- Altschuler R.A., Mosinger J.W., Hoffman D.W. y Parakkal M.H. (1982). Immunocytochemical localization of enkephalin-like immunoreactivity in the retina of Guinea pig. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:2398-2400.
- Amstrong S.M. (1989). Melatonin and circadian control in mammals. *Experientia* 45:932-938.
- Anand R., Peng S., Ballesta J.J. y Lindstrom J. (1993). Pharmacological characterization of  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive acetylcholine receptors immunisolated from chick retina: Contrasting properties of  $\alpha_7$ ,  $\gamma$  y  $\alpha_8$  subunit-containing subtypes. *Mol. Pharmacol.* 44:1046-1050.
- Andres H.H., Klem A.J., Schopfer L.M., Harrison J.K. y Weber W.W. (1988). On the active site of liver acetyl-CoA. Arylamine N-acetyltransferase from rapid acetylator rabbits (III/J). *J. Biol. Chem.* 263:7521-7527
- Avendano G., Butler B.J. y Iuvone P.M. (1990).  $K^+$ -evoked depolarization increases serotonin N-acetyltransferase activity in photoreceptor-enriched retinal cell cultures. Involvement of calcium influx through L-type calcium channels. *Neurochem. Int.* 17:117-126.
- Ayoub G.S., Koremborot J.L. y Copenhagen D.R. (1989). Release of endogenous glutamate from isolated cone photoreceptors of the lizard. *Neurosci. Res.* 10:S47-S56.
- Babey A.M., Palmour R.M. y Young S.N. (1994). Caffeine and propranolol block the increase in rat pineal melatonin production produced by stimulation of adenosine receptors. *Neurosci. Lett.* 176:93-96.
- Baker P.C. (1966). Development of 5-hydroxytryptophan decarboxilase in the brain, eye and whole embryo of *Xenopus laevis*. *Neuroendocrinology* 1:257-264.
- Ball A.K., Weiller R. y Ammermuller J. (1988) GABAergic amacrine cells in goldfish and turtle retinas. *Proc. Int. Soc. Eye Res.* 19
- Barnes J.M., Barnes N.M., Brunken W.J. y Robertson D.W. (1991). Identification of 5-HT<sub>3</sub> receptor reconition sites in rabbit retina. En: "5-Hydroxytryptamine-CNS Receptors and Brain Function". *Proceedings of the International Conference of serotonin held at Birmingham University Birmingham. U.K.*
- Bartness T.J. y Goldman B.D. (1989). Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia* 45:939-945.

- Bauhgman R.W. y Bader C.R. (1977). Biochemical characterization and cellular localizatation or the cholinergic system in the chicken retina. *Brain Res.* 138:469-485.
- Begay V., Bois P. Collin J.P., Lenfant J. y Falcón J. (1994). Calcium and melatonin production in dissociated trout pineal photoreceptor cells in culture. *Cell Calcium* 16:37-46.
- Behrens U.D. y Wagner H.J. (1995). Localization of dopamine D<sub>1</sub>-receptors in vertebrate retinae. *Neurochem. Int.* 6:497-507.
- Bennis M. y Versaux-Botteri C. (1995). Catecholamine-, indoleamine-, and GABA-containing cells in the chameleon retina. *Vis. Neurosci.* 12:785-792
- Bernard M., Guerlotté J., Cogné M., Grève P., Collin J.P. y Voisin P. (1993). Transcriptional regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase in the chicken pineal gland: day/night changes and long-term effects of light and darkness. *Biochem. J.* 290:661-664.
- Bernard M., Iuvone P.M., Cassone V.M., Roseboom P.H., Coon S.L. y Klein D.C. (1997). Avian melatonin synthesis: Photic and circadian regulation of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland and retina. *J. Neurochem.* 68:213-224.
- Besharse J.C. (1986). Photosensitive membrane turnover: differentiated membrane domains and cell-cell interaction. En: "*The retina: a model for Cell Biology studies*". Eds. Adler R. y Farber D. Academic Press. London. pp. 297-352.
- Besharse J.C y Dunis D.A. (1983). Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding. *Science* 219:1341-1343.
- Besharse J.C. y Iuvone P.M. (1983). Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature* 305:133-135.
- Besharse J.C., Dunis D.A. y Iuvone P.M. (1984). Regulation and possible role of serotonin N-acetyltransferase in the retina. *Fed. Proc.* 43:20704-2708.
- Besharse J.C., Iuvone P.M. y Pierce M.E. (1988). Regulation of rhythmic photoreceptor metabolism: A role for post-receptor neurons. *Prog. Retinal Res.* 7:21-61.
- Biedermann B., Frohlich E., Grosche J., Wagner H.J. y Reichenbach A. (1995). Mammalian Muller (glial) cells express functional D<sub>2</sub> dopamine receptors. *Neuroreport* 6:609-612.

- Blazynski C. (1987) Adenosine A<sub>1</sub> receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in rabbit retina. *J. Neurochem.* 54:648-655.
- Blazynski C. (1990). Discrete distributions of adenosine receptors in mammalian retina. *J. Neurochem.* 54:648-655
- Blazynski C. (1993). Characterization of adenosine A<sub>2</sub> receptors in bovine retinal pigment epithelial membranes. *Exp. Eye Res.* 56:595-599.
- Blazynski C. y Dubocovich M.L. (1991). Localization of 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in mammalian retina. *J. Neurochem.* 56:1873-1880.
- Blazynski C. y McIntosh H. (1993). Characterization of adenosine A<sub>2</sub> receptors in bovine retinal membranes. *Exp. Eye Res.* 56:585-593.
- Blazynski C., Ferrendelli J.A. y Cohen A.I. (1985). Indoleamine-sensitive adenylate-cyclase in rabbit retina: characterization and distribution. *J. Neurochem.* 45:440-447.
- Blazynski C., Cohen A.I., Früh B. y Niemeyer G. (1989a). Adenosine: autoradiographic localization and electrophysiologic effect in the cat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30:2533-2536.
- Blazynski C., Mosinger J.L. y Cohen A.I. (1989b). Comparison of adenosine uptake and endogenous adenosine-containing cells in mammalian retina. *Vis. Neurosci.* 2:109-116.
- Boadler-Biber M.C. (1980). Activation of tryptophan hydroxylase from slices of rat brain stem incubated with N<sup>6</sup>,O<sup>2</sup>-dibutyryl-adenosine-3':5'-cyclic mono-phosphate. *Biochem. Pharmacol.* 29:669-672.
- Boadle-Biber M.C. (1982). Blockade by haloperidol of the increase in tryptophan hydroxylase activity induced by incubation of slices of brain stem with dibutyryl cyclic AMP. *Biochem. Pharmacol.* 31:2203-2207.
- Boadle-Biber M.C. y Phan T.H. (1987). Involvement of calmodulin-dependent phosphorylation in the activation of brainstem tryptophan hydroxylase induced by depolarization of slices or other treatments that raise intracellular free calcium levels. *Biochem. Pharmacol.* 36:1174-1176.

- Boatright J.H., Hoel M.J. y Iuvone P.M. (1989) Stimulation of endogenous dopamine release and metabolism in amphibian retina by light and K<sup>+</sup>-evoked depolarization. *Brain Res.* 482:164-168.
- Boatright J.H., Rubim N.M. y Iuvone P.M. (1994). Regulation of endogenous dopamine release in amphibian retina by melatonin: the role of GABA. *Vis. Neurosci.* 11:1013-1018.
- Borges S. y Wilson M. (1991). Dual effect of glycine on horizontal cells of the tiger salamander retina. *J. Neurophysiol.* 66:1993-2001
- Borjigin J., Wang M.M. y Snyder S.H. (1995). Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 378:783-785.
- Borowsky B., Mezey E. y Hoffman B.J. (1993). Two glycine transporter variants with distinct localization in the CNS and peripheral tissues are encoded by a single gene. *Neuron* 7:287-293.
- Boularand S., Darmon M.C., Ganem Y., Launay J.M. y Mallet J. (1990). Complete coding sequence of human tryptophan hydroxylase. *Nucleic Acids Res.* 18:4257
- Bourmann J., Rundström N., Betz H. y Langosch D. (1993). Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J.* 12:3729-3737.
- Braas K.M., Zarbin M.A. y Snyder S.H. (1987) Endogenous adenosine and adenosine receptors localized to ganglion cells of the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:3906-3910.
- Brandon C., Lam D.M.K., Su Y.Y.T. y Wu J.Y. (1980). Immunocytochemical localization of GABA neurons in the rabbit and frog retina. *Brain Res. Bull.* 5 Suppl. 2:21-29.
- Brann M.R. y Young W.S. (1986) Dopamine receptors are located on rods in bovine retina. *Neurosci. Lett.* 69:221-226.
- Braunagel S.C., Xiao J.G. y Chiou G.C.Y. (1988) The potential role of adenosine in regulating blood flow in the eye. *J. Ocul. Pharm.* 4:61-73.
- Brecha N.C., Sharma S.C. y Karten H.J. (1981). Localization of substance P-like immunoreactivity in the adult and developing goldfish retina. *Neuroscience* 6:2737-2746.

- Britto L.R. y Hamassaki-Britto D.E. (1993). Different subsets of displaced ganglion cells in the pigeon retina exhibit cholecystokinin-like and enkephalin-like immunoreactivities. *Neuroscience* 52:403-413
- Brunken W.J., Witkovsky P. y Karten H.J. (1986). Retinal neurochemistry of three elasmobranch species: an immunohistochemical approach. *J. Comp. Neurol.* 243:1-2.
- Bruns R.F., Daly J.W. y Snyder S.G.H. (1980) Adenosine receptors in brain membranes: binding of N<sup>6</sup>-cyclohexyl[<sup>3</sup>H]adenosine and 1,3-diethyl-8-[<sup>3</sup>H]phenylxantine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 77:5547-5551
- Bruun A., Edvinsson L. y Ehinger B. (1994) Neuropeptide Y inhibits adenylyl cyclase activity in rabbit retina. *Acta Ophthalmol. Copenh.* 72:326-331.
- Bruun A., Tornqvist K. y Ehinger B. (1986). Neuropeptide Y (NPY) immunoreactive neurons in the retina of different species. *Histochemistry* 86:135-140.
- Bubenik G.A. y Purtil R.A. (1980). The role of melatonin and dopamine in retinal physiology. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58:1457-1462.
- Burnside B., Evans M., Fletcher R.T. y Chader G.J. (1982). Induction of dark-adaptative retinomotor movement (cell elongation) in teleost retinal cones by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Gen. Physiol.* 79:759-774.
- Cahill G.M. (1996). Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Res.* 708:177-181.
- Cahill G.M. y Besharse J.C. (1990). Circadian regulation of melatonin in the retina of *Xenopus laevis*: Limitation by serotonin availability. *J. Neurochem.* 54:716-719
- Cahill G.M. y Besharse J.C. (1991). Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: Regulation of retinal melatonin rhythms by light and D<sub>2</sub> dopamine receptors. *J. Neurosci.* 11:2959-2971.
- Cahill G.M. y Besharse J.C. (1992). Light-sensitive melatonin synthesis by *Xenopus* photoreceptors after destruction of the inner retina. *Vis. Neurosci.* 8:487-490
- Cahill G.M. y Besharse J.C. (1993). Circadian clock functions localized in *Xenopus* retinal photoreceptors. *Neuron* 10:573-577.

- Campochiaro P.A. y Sen H.A. (1989) Adenosine and its agonists cause retinal vasodilation and hemorrhages. *Arch. Ophthalmol.* 107:412-416.
- Cardinali D.P. y Rosner J.M. (1971). Retinal localization of hydroxyinole-O-methyltransferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology* 89:301-303.
- Carlsson A., Davis J.N., Kehr W., Lindqvist M. y Atack C.V. (1972). Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain *in vivo* using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 275:153-168.
- Carusso D.M., Owezarszak M.T., Goebel D.J., Hazlett J.C. y Pourcho R.G. (1989). GABA immunoreactive ganglion cells in the rat retina. *Brain Res.* 476:128-134.
- Casini G. y Brecha N.C. (1992). Colocalization of vasoactive intestinal polypeptide and GABA immunoreactivities in a population of wide-field amacrine cells in the rabbit retina. *Vis. Neurosci.* 8:373-378
- Cassone V.M. (1990). Effects of melatonin on vertebrate circadian system. *TINS* 13:457-464.
- Cazevieuille C. y Osborne N.N. (1991). Retinal neurons containing kainate receptors are influenced by exogenous kainate and ischaemia while neurones lacking these receptors are not. Melatonin counteracts the effects of ischaemia and kainate. *Brain Res.* 755:91-100.
- Cheze G. y Ali M.A. (1976). Role de l'epiphyse dans la migration du pigment epithelial retinien chez quelques Teleosteens. *Can. J. Zool.* 54:475-481.
- Chomczynski P. y Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Chong N.W.S. y Sugden D. (1991). Guanine nucleotides regulate 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in chicken retinal pigment epithelium but nor in neuronal retina. *J. Neurochem.* 57:685-689.
- Clark V.M. (1986). The cell biology of the retinal pigment epithelium. En: "*The retina: a model for cell biology studies*". Eds. Adler R. y Farber D. Academic Press, London.

- Clement-Cormier Y.C., Parrish R.G., Petzold G.L., Kebebian J.E. y Greengard P. (1975). Characterization of a dopamine-sensitive adenylate cyclase in the rat caudate nucleus. *J. Neurochem.* 25:142-149.
- Cohen A.I. (1987). Cyclic nucleotides and retinal cones. *Neurochem. Res.* 12:501-505.
- Cohen A.I., Todd R.D., Harmon S. y O'Malley L. (1992). Photoreceptors of mouse retinas possess D<sub>4</sub> receptors coupled to adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89:12093-12097.
- Coon S.L., Roseboom P.H., Baler R., Weller J.L., Narboodiri M.A. A., Koonin E.V. y Klein D.C. (1995). Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 270:1681-1683.
- Coon S.L., Mazuruk K., Bernard M., Roseboom P.H., Klein D.C. y Rodriguez I.R. (1996) The human serotonin N-acetyltransferase (E.C. 2.3.1.87) gene (AA-NAT): structure, chromosomal localization and tissue expression. *Genomics* 34:76-84.
- Copenhagen D.R. y Jarh C.E. (1989). Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors. *Nature* 341:536-539.
- Corey D.P., Dubinsky J.M. y Schwartz E.A. (1984). The calcium current in inner segments of rods from the salamander (*Ambystoma tigrinum*) retina. *J. Physiol.* 354:557-575.
- Crooks J. y Kolb H. (1992). Localization of GABA, glycine, glutamate and tyrosine hydroxylase in the human retina. *J. Comp. Neurol.* 315:287-302
- Crosson C.E., DeBenedetto R. y Giddy J.M. (1994). Functional evidence for retinal adenosine receptors. *J. Ocular Pharmacol.* 10:499-507.
- Cutcliffe N. y Osborne N.N. (1987). Serotonergic and cholinergic stimulation of inositol phosphate formation in the rabbit retina. Evidence for the presence of serotonin and muscarinic receptors. *Brain Res.* 421:95-104.
- Dalziel H.H. y Westfall D.P. (1994). Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol. Rev.* 46:449-466.

- Darmon M.C., Guibert B., Leviel V., Ehret M., Maitre M. y Mallet J. (1988). Sequence of two mRNAs encoding active rat tryptophan hydroxylase. *J. Neurochem.* 51:312-316.
- Day N.S., Koutz C.A. y Anderson R.E. (1993). Inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the vertebrate retina. *Curr. Eye Res.* 12:981-992.
- Dearry A. y Burnside B. (1986). Dopamine regulation of cone reinomotor movement in isolated teleost retinas: I. Induction of cone contraction is mediated by D<sub>2</sub> receptors. *J. Neurochem.* 46:1006-1021.
- Dearry A. y Burnside B. (1988). Stimulation of distinct D<sub>2</sub> dopamine and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors induces light-adaptive pigment dispersion in teleost retinal pigment epithelium. *J. Neurochem.* 51:1516-1523.
- Dearry A., Gingrich J., Falardeau P., Fremeau R., Bates M. y Caron M. (1990a) Molecular cloning and expression of the gene for a human D<sub>1</sub> dopamine receptor. *Nature* 347:72-76.
- Dearry A., Edelman J., Miller S. y Burnside B. (1990b). Dopamine induces light-adaptive retinomotor movements in bullfrog cones via D<sub>2</sub> receptors in retinal pigment epithelium via D<sub>1</sub> receptors. *J. Neurochem.* 54:1367-1378.
- De Camilli P., Macconi D. y Spada A. (1979). Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin-secreting pituitary adenomas. *Nature* 278:252-254.
- De Keyser J., Dierckx R., Vanderheyden P., Ebinger G. y Vauquelin G. (1988). D<sub>1</sub> dopamine receptors in human putamen, frontal cortex and calf retina. Differences in guanine nucleotide regulation of agonist binding and adenylate cyclase stimulation. *Brain Res.* 443:77-84.
- Delgado M.J. y Vivien-Roels B. (1989). Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eyes, and plasma of the frog, *Rana perezi*: importance of ocular melatonin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75:46-53.
- Delgado M.J., Alonso-Gómez A.L., Gancedo B., De Pedro N., Valenciano A.I. y Alonso-Bedate M. (1993). Serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity and melatonin levels in the frog retina are not correlated during seasonal cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92:143-150.

- Denton E.J. y Wyllie J.H. (1955). Study of the photosensitive pigments in pink and green rods of the frog. *J. Physiol. Lond.* 127:81-89.
- Denton T.L., Yamashita C.K. y Farber D.B. (1992). The effects of light on cyclic nucleotide metabolism of isolated cone photoreceptors. *Exp. Eye Res.* 54:229-237.
- De Vries S.H. y Schwartz E.A. (1989). Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messenger. *J. Physiol.* 414:351-375.
- Dickman M. y Tran V. (1990). D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors are differentially localized in the rat retina. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci. Suppl.* 3:331.
- Dixon D.B. y Copenhagen D.R. (1992). Two type of glutamate receptors differentially excite amacrine cells in the tiger salamander retina. *J. Physiol.* 449:589-606
- Djamgoz M.B.A. (1995). Diversity of GABA receptors in vertebrate outer retina. *Trends in Neurosci.* 18:118-120.
- Dkshissi O., Dalil-Thiney N., Versaux-Botteri C., Canut E., Reperant J.Y. y Nguyen-Legros J. (1993). Dopaminergic interplexiform cells in the retina of pigmented and hypopigmented quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Ophthalmic. Res.* 25:280-288.
- Dolphin A.C. y Prestwich S.A. (1985). Pertussin toxin reverses adenosine inhibition of neuronal glutamate release. *Nature* 316:148-150.
- Dowling J.E. y Ehinger B. (1975). Synaptic organization of the amacrine-containing interplexiform cells of the goldfish and *Cebus* monkey retina. *Science* 188:270-273.
- Duarte C.B., Santos P.F. y Carvalho A.P. (1996). [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> regulation by glutamate receptor agonists in cultured chick retina cells. *Vision Res.* 36:1091-1102
- Dubocovich M.L. (1983). Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* 306:782-784.
- Duggleby R.G. (1981). A nonlinear regression program for small computers. *Anal. Biochem.* 110:9-18.

- Dumas S., Darmon M.C., Delort J. y Mallet J. (1989). Differential control of typtophan hydroxylase expression in raphe and in pineal gland: Evidence for a role of translation efficiency. *J. Neurosci. Res.* 24:537-547.
- Duran R., Reis R.A., Almeida O.M., De Mello M.C. y De Mello F.G. (1995) Domoic acid induces neurotoxicity and IP3 mobilization in cultured cells of embryonic chick retina. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28:100-107.
- Dutrait N., Culcasi M., Cazevielle C., Pietri S., Tordo P., Bonne C. y Muller A. (1995). Calcium-dependent free radical generation in cultured retinal neurons injured by kainate. *Neurosci. Lett.* 198:13-16.
- Dvorak D.R. y Morgan I.J. (1983). Intravitreal kainic acid permanently eliminates off-pathways from chicken retina. *Neurosci. Lett.* 36:249-53.
- Eckenstein F. y Thoenen H. (1982). Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. *EMBO Journal.* 1:363-368.
- Ehinger B. (1982). Neurotransmitter system in the retina. *Retina* 2:305-21.
- Ehinger B. y Pérez M.T.R. (1984). Autoradiography of nucloside uptake into the retina. *Neurochem. Int.* 6:369-381.
- Ehinger B., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J. y Dowling J.E. (1988). Bipolar cells in turtle retina are strongly immunoreactive for glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85:8321-8325.
- Ehret M., Cash C.D., Hamon M. y Maitre M. (1989). Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by  $Ca^{2+}$ /calmodulin dependent protein kinase. *J. Neurochem.* 52:1886-1891.
- Ehret M., Pévet P. y Maitre M. (1991). Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J. Neurochem.* 57:1516-1521
- Ehrlich D., Keyser K.T. y Karten H.J. (1987). Distribution of substance P-like immnoreactive retinal ganglion cells and their pattern of termination in the optic tectum of chick (*Gallus gallus*). *J. Comp. Neurol.* 266:220-233.

- Eichler V.B. y Moore R.Y. (1975). Studies on hydroxyindole-O-methyltransferase in frog brain and retina: enzymology, regional distribution and environmental control of enzyme levels. *Comp. Biochem. Physiol.* 50:89-95.
- Eldred W.D. y Cheung K. (1989). Immunocytochemical localization of glycine in the retina of the turtle (*Pseudemys scripta*). *Vis. Neurosci.* 2:331-338.
- Eldred W.D. Y Karten H.J. (1983). Characterization and quantification of peptidergic amacrine cells in the turtle retina: enkephalin, neurotensin, and glucagon. *J. Comp. Neurol.* 221:371-381.
- Eliasof S. y Werblin F. (1993) Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander. *J. Neurosci.* 13:402-411.
- Engbretson G.A. y Battelle B.A. (1987). Serotonin and dopamine in the retina of a lizard. *J. Comp. Neurol.* 257:140-147.
- Enjalbert A. y Bockaert J. (1983). Pharmacological characterization of the D<sub>2</sub> dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol. Pharmacol.* 23:576-584.
- Eskay R.L., Furness J.F. y Long R.T. (1981). Substance P activity in the bullfrog retina: localization and identification in several vertebrate species. *Science* 212:1049-1051.
- Euler T. Schneider H y Wassle H. (1996). Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. *J. Neurosci.* 16:2934-2944
- Faillace M.P., Cutrera R., Sarmiento M.I. y Rosenstein R.E. (1995). Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina. *Neuroreport* 6:2093-2095
- Faillace M.P., Sarmiento M.I.K. y Rosenstein R.E. (1996). Melatonin effect on [<sup>3</sup>H]glutamate uptake and release in the golden hamster retina. *J. Neurochem.* 67:623-628.
- Fain G.L., Gerschenfeld H.M. y Quandt F.N. (1980). Calcium spikes in toad rods. *J. Physiol.* 303:495-513.
- Falcón J., Brun-Marmillon J., Claustrat B. y Collin J.C (1988). Melatonin production in organ cultured chicken pineal: Modulation by adenosine and its analogs. *Plüfers Arch.* 413:93-95.

- Falcón J., Thibault C., Martin C., Brun-Marmillon J., Claustrat B. y Collin J.C (1991). Regulation of melatonin production by catecholamines and adenosine in a photoreceptive pineal organ. An *in vitro* study in the pike and the trout. *J. Pineal Res.* 11:123-134.
- Famiglietti E.V. (1983). Starburst amacrine cells and cholinergic neurons: Mirror-symmetric ON and OFF amacrine cells of rabbit retina. *Brain Res.* 261:138-144.
- Famiglietti E.V. y Kolb H. (1975). A bistratified amacrine cells and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res.* 84:293-300.
- Famiglietti E.V. y Kolb H. (1976). Structural basis for ON- and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science* 194:193-195.
- Farber D.B., Souza D.W., Chase D.G. y Lolley R.N. (1981). Cyclic nucleotides of cone-dominant retinas: reduction of cyclic AMP levels by light and cone degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 20:24-31.
- Feigenspan A., Wassle H. y Bormann J. (1993). Pharmacology of GABA receptor Cl<sup>-</sup> channels in the rat retinal bipolar cells. *Nature* 361:159-162.
- Ferreira I.L., Duarte C.B. y Carvalho A.P. (1996). Ca<sup>2+</sup> influx through glutamate receptor-associated channels in retina cells correlates with neuronal cell death. *Eur. J. Pharmacol.* 302:153-162
- Firth S.I., Morgan I.G. y Boelen M.K. (1997). Localization of D<sub>1</sub> dopamine receptors in the chicken retina. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* 25 Suppl 1:S64-S66
- Florez J.C. y Takahashi J.S. (1996a). Quantitative two-dimensional gel analysis of clock-controlled proteins in cultured chick pineal cells: circadian regulation of tryptophan hydroxylase. *J. Biol. Rhythms* 11:241-257.
- Florez J.C. y Takahashi J.S. (1996b). Regulation of tryptophan hydroxylase by cyclic AMP, calcium, norepinephrine, and light in cultured chick pineal cells. *J. Neurochem.* 67:242-250.
- Florez J.C., Seidenman K.J., Barrett R.K., Sangoram A.M. y Takahashi J.S. (1996). Molecular cloning of chick pineal tryptophan hydroxylase and circadian oscillation of its mRNA levels. *Mol. Brain Res.* 42:25-30.

- Freedman J.E. y Weight F.F. (1988). Single K<sup>+</sup> channels activated by D<sub>2</sub> dopamine receptors in acutely dissociated neurons from rat corpus striatum. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:3618-3622.
- Früh B., Niemeyer G. y Onoe S. (1989). Adenosine enhances the ERG b-wave and depresses the light peak in perfused cat eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (Suppl.)* 30:124.
- Fukuda K., Saito N., Yamamoto M. y Tanaka C. (1994). Immunocytochemical localization of the alpha-, beta I-, beta II- and gamma-subspecies of protein kinase C in the monkey visual pathway. *Brain Res.* 658:155-162
- Gan J. y Iuvone P.M. (1997). Depolarization and activation of dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels stimulate inositol phosphate accumulation in photoreceptor-enriched chick retinal cell cultures. *J. Neurochem.* 68:2300-2307.
- Gan J., Alonso-Gómez A.L., Avendano G., Johnson B. y Iuvone P.M. (1995). Melatonin biosynthesis in photoreceptor-enriched chick retinal cell cultures: role of cyclic AMP in the K<sup>+</sup>-evoked, Ca<sup>2+</sup>-dependent induction of serotonin N-acetyltransferase activity. *Neurochem. Int.* 27:147-155.
- Garber S.L. y Makman M.H. (1987). Regulation of tryptophan hydroxylase activity by a cyclic AMP-dependent mechanism in rat striatum. *Mol. Brain Res.* 3:1-10.
- Gauer F. y Craft C.M. (1996). Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Res.* 737:99-109
- Geiger J.D. (1986). Localization of [<sup>3</sup>H]cyclohexyladenosine and [<sup>3</sup>H]nitrobenzylthioinosine binding sites in rat striatum and superior colliculus. *Brain Res.* 363:404-408.
- Gern W.a., Wehler E. y Duvall D. (1989). Characteristic and non-rhythmicity of retinal hydroxyindole-O-methyltransferase activity in trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 53:169-178.
- Gerschefeld H.M., Neyton J., Piccolin M. y Witkovsky P. (1982). L-horizontal cells of the turtle: network organization and coupling modulation. En: "*Biomedical Research (Suppl.)*" Eds. Kaneko A., Tsukahara N. y Ucnizono K. Biomedical research Fdn. Tokyo. pp. 21-32.

- Ghalayini A.J., Koutz C.A., Wetsel W.C., Hannun Y.A. y Anderson R.E. (1994). Immunolocalization of PKC zeta in rat photoreceptor inner segments. *Curr. Eye Res.* 13: 145-150.
- Gharib A., Reynaud D., Sarda N., Vivien-Roels B., Pévet P. y Pacheco H. (1989). Adenosine analogs elevate N-acetylserotonin and melatonin in rat pineal gland. *Neurosci. Lett.* 106:345-349.
- Gilbertson T.A., Borges S. y Wilson M. (1991). The effects of glycine and GABA on isolated horizontal cells from the salamander retina. *J. Neurophysiol.* 66:2002-2013
- Gingrich J.A. y Caron M.G. (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Rev. Neurosci.* 16:299-322
- Gleason E., Mobbs P., Nuccitelli R., Wilson M. (1992). Development of functional calcium channels in cultured avian photoreceptors. *Visual Neurosci.* 8:315-327.
- Godley B.F. y Wurtman R.J. (1988). Release of endogenous dopamine from the superfused rabbit retina in vitro: effect of light stimulation. *Brain Res.* 452:393-395.
- Goodman R.R., Kuhar M.J., Hester L. y Snyder S.H. (1983). Adenosine receptors: autoradiographic evidence for their localization on axon terminals of excitatory neurons. *Science* 220:967-969.
- Grabiel R., Straznicky C. y Wye-Dvorak J. (1992). GABA-like immunoreactive neurons in the retina of *Bufo marinus*: evidence for the presence of GABA-containing ganglion cells. *Brain Res.* 571:175-179.
- Grant G.B. y Werblin F.S. (1990) Dopaminergic modulation of a sustained voltage-gated calcium current in vertebrate rods of the tiger salamander. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (Suppl.)* 31:176.
- Grant G.B. y Werblin F.S. (1996). A glutamate-elicited chloride current with transporter-like properties in rod photoreceptors of the tiger salamander. *Vis. Neurosci.* 13:135-144
- Green C.B. y Besharse J.C. (1994) Tryptophan hydroxylase expression is regulated by a circadian clock in *Xenopus laevis* retina. *J. Neurochem.* 62:2420-2428.
- Green C.B., Cahill G.M. y Besharse J.C. (1995a). Regulation of tryptophan hydroxylase expression by a retinal circadian oscillator *in vitro*. *Brain Res.* 677:283-290.

- Green C.B., Cahill G.M. y Besharse J.C. (1995b). Tryptophan hydroxylase is expressed by photoreceptors in *Xenopus laevis* retina. *Visual Neurosci.* 12:663-670.
- Greferath U., Brandstatter J.H., Wassle H, Kirsch J., Kuhse J. y Grunert U. (1994). Differential expression of glycine receptor in the retina of the rat: A study using immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *Visual Neurosci.* 11:721-729.
- Greferath U., Grunert U., Fritschy J.M., Stephenson A., Mohler H. y Wassle H. (1995). GABA<sub>A</sub> receptors subunits have differential distribution in the rat retina: *In situ* hybridization and immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* 353:553-571.
- Grennet H.E., Ledley F.D., Reed L.L. y Woo S.L. (1987). Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:5530-5534.
- Grève P., Bernard M., Alonso-Gómez A.L., Klein D.C. y Iuvone P.M. (1997). Serotonin N-acetyltransferase mRNA and activity in photoreceptor-enriched retinal cell cultures. Melatonin:40 years after discovery. *AsiaPacific Pineal Meeting.*
- Grunert U. y Wassle H. (1996). Glycine receptors in the rod pathway of the macaque monkey retina. *Vis. Neurosci.* 13:101-115
- Guerlotté J., Grève P., Bernard M., Grechez-Cassiau A., Morin F., Collin J.P. y Voisin P. (1996). Hydroxyindole-O-methyltransferase in the chicken retina: immunocytochemical localization and daily rhythm of mRNA. *Eur. J. Neurosci.* 8:710-715.
- Halberg F. y Reinberg A. (1967). Rythmes circadiens et rythmes de basse fréquence en physiologie humaine. *J. Physiol. (Paris)* 59:117-200.
- Hamm H.E. y Menaker M. (1980). Retinal rhythm in chicks: Circadian variations in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 77:4998-5002.
- Hamon M. Bourgoin S. y Glowinski J. (1973). Feedback regulation of 5-HT synthesis in rat striatal slices. *J. Neurochem.* 20:1727-1745.
- Hamon M., Bouthoin D., Artaud F. y Glowinski J. (1979). The role of intra-neuronal 5-HT and of tryptophan hydroxylase activation in the control of 5-HT synthesis in rat brain slices incubated in K<sup>+</sup>-enriched medium. *J. Neurochem.* 33:1031-1042.

- Hampton C.K., Garcia C. y Redburn D.A. (1981). Localization of kainic acid-sensitive cells in mammalian retina. *J. Neurosci. Res.* 6:99-110
- Hanani M. y Vallergera S. (1980) Rod and cone signal in the horizontal cells of the tiger salamander retina. *J. Physiol.* 298:397-405.
- Haque R., Uchida K. y Iuvone P.M. (1998). 8-BrcGMP and cGMP phosphodiesterase (PDE) inhibitors stimulate intracellular calcium levels and inositol phosphate accumulation in cultured chick photoreceptor cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:S1056
- Harveit E., Brandstatter J.H., Sassoe-Pognetto M., Laurie D.J., Seeburg P.H. y Wassle H. (1994). Localization and developmental expression of the NMDA receptors subunit NR2A in the mammalian retina. *J. Comp. Neurol.* 348:570-582.
- Hashiguchi H., Nakahara D., Maruyama W., Naoi M. y Ikeda T. (1993). Simultaneous determination of tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase activity *in situ* by microdialysis/HPLC technique: its application to a study on the interaction between dopamine and serotonin synthesis. *J. Neural Transm. [Gen Sect]* 93:213-223.
- Hashimoto Y., Nakayama T., Teramoto T., Kato H., Watanabe T., Kinoshita M., Tsukamoto K., Tokunaga K., Kurokawa K. y Nakanishi S. (1991). Potent and preferential inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by K252a and its derivative, KT5926. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181:423-429.
- Hewitt A.T. (1986). Extracellular matrix molecules: their importance in the structure and function of the retina. En: "*The retina: a model for Cell Biology studies*". Parte II. Eds. Adler R. y Farber D. Academic Press (London). pp. 169-214.
- Hillman D.W., Lin D. y Burnside B. (1995). Evidence for D<sub>4</sub> receptor regulation of retinomotor movement in isolated teleost cone inner-outer segments. *J. Neurochem.* 64:1326-1335.
- Hiscock J. y Straznicky C. (1989). Morphological characterization of substance P-like immunoreactive amacrine cells in the anuran retina. *Vision Res.* 29:239-301.
- Hiscock J. y Straznicky C. (1990). Neuropeptide Y- and substance P-like immunoreactive amacrine cells in the retina of the developing *Xenopus laevis*. *Develop. Brain. Res.* 54:105-113.

- Hokoc J.N. y Mariani A.P. (1988) Sinapses from bipolar cells onto dopaminergic amacrine cells in cat and rabbit retinas. *Brain Res.* 461:17-26.
- Holmgren-Taylor I. (1983). Synaptic organization of the indoleamine-accumulating neurons in the cyprinid retina. *Cell Tiss. Res.* 229:317-335.
- Honda S., Yamamoto M. y Saito N. (1995). Immunocytochemical localization of three subtypes of GABA transporter in rat retina. *Mol. Brain Res.* 33:319-325.
- Hutsler J.J. y Chalupa L.M. (1994). Neuropeptide Y immunoreactivity identifies a regularly arrayed group of amacrine cells within the cat retina. *J. Comp. Neurol.* 346:481-489.
- Isayama T. y Eldred W.D. (1988). Neuropeptide Y-immunoreactive amacrine cells in the retina of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J. Comp. Neurol.* 271:56-66.
- Iuvone P.M. (1986). Evidence for a D<sub>2</sub> dopamine receptor in frog retina that decrease cyclic AMP accumulation and serotonin N-acetyltransferase activity. *Life Sci.* 38:331-342.
- Iuvone P.M. (1996). Circadian rhythms of melatonin biosynthesis in retinal photoreceptor cells: Signal transduction, interactions with dopamine and speculation on a role in cell survival. En: "*Retinal Degeneration and Regeneration*". Eds. Kato S., Osborne N.N., Tamai M. Kugler Publications. Amsterdam/New York. pp. 3-13.
- Iuvone P.M., Galli C.L., Garrison-Gund C.K. y Neff N.H. (1978). Light stimulates tyrosine hydroxylase and dopamine synthesis in retinal amacrine neurons. *Science* 202:901-902.
- Iuvone P.M. y Besharse J.C. (1983) Regulation of indoleamine N-acetyltransferase activity in the retina: effects of light and dark, protein synthesis inhibitors and cyclic nucleotide analogues. *Brain Res.* 273:111-119
- Iuvone P.M. y Besharse (1986a). Cyclic AMP stimulates serotonin N-acetyltransferase activity in *Xenopus* retina in vitro. *J. Neurochem.* 46:33-39.
- Iuvone P.M. y Besharse (1986b). Involvement of calcium in the regulation of serotonin N-acetyltransferase in retina. *J. Neurochem.* 46:82-88.
- Iuvone P.M. y Besharse J.C. (1986c). Dopamine receptor-mediated inhibition of serotonin N-acetyltransferase activity in retina. *Brain Res.* 369:168-176.

- Iuvone P.M., Boatright J.H. y Bloom M.M. (1987). Dopamine mediates the light-evoked suppression of serotonin N-acetyltransferase activity in retina. *Brain Res.* 418:314-324.
- Iuvone P.M., Avendano G. Butle B.J. y Adler R. (1990). Cyclic AMP-dependent induction of serotonin N-acetyltransferase activity in photoreceptor-enriched chick retinal cell cultures: Characterization and inhibition by dopamine. *J. Neurochem.* 55:673-682.
- Iuvone P.M., Gan J. y Avendano G. (1991). K<sup>+</sup>-Evoked depolarization stimulates cyclic AMP accumulation in photoreceptor-enriched retinal cell cultures: Role of calcium influx through dihydropyridine-sensitive calcium channels. *J. Neurochem.* 57:615-621.
- Iuvone P.M. y Gan J. (1994). Melatonin receptor-mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in chick retinal cell cultures. *J. Neurochem.* 63:118-124.
- Iuvone P.M. y Alonso-Gómez A.L. (1995). Multiple roles of calmodulin in melatonin biosynthesis by photoreceptor cells: regulation of calcium influx and adenylate cyclase activity. *Soc. Neurosci. Abs.* 21:1036
- Iuvone P.M., Taylor M.M. y Goe L.C. (1995a). Melatonin biosynthesis in chicken photoreceptor cells: dopamine regulates the sensitivity to inhibition by acute light exposure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36:S512.
- Iuvone P.M., Gan J. y Alonso-Gómez A.L. (1995b). 5-Methoxytryptamine inhibits cyclic AMP accumulation in cultured retinal neurons through activation of a pertussis toxin sensitive site distinct from the 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding site. *J. Neurochem.* 64:1892-1895.
- Iuvone P.M., Alonso-Gómez A.L., Gan J. y Drummond M.B. (1996). Calmodulin-sensitive adenylate cyclase regulation and melatonin synthesis in photoreceptor-enriched cell cultures: Possible role of protein kinase C. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:S635.
- Iuvone P.M. y Alonso-Gómez (1997a). Mechanism of action of dopamine in cultured photoreceptor cells: modulation of calcium influx. *Proc. Keystone Symp. Ocular Cell & Mol. Biol.* 24.
- Iuvone P.M. y Alonso-Gómez (1997b). Melatonin in the vertebrate retina. En: "Les Séminaires Ophthalmologiques d'IPSEN" Eds. Y. Christen, M. Doly, M.-T. Droy-Lefaix. Irvinn. Paris. Tomo 9 pp. 49-62.

- Izumi Y., Benz A.M., Kurby C.O., Labruyere J., Zorumski C.F. Price M.T. y Olney J.W. (1995). An *ex vivo* rat retinal preparation for excitotoxicity studies. *J. Neurosci. Methods* 60:219-25
- Jacobowitz O., Chen J., Premont R.T. y Iyengar R. (1993). Stimulation of specific types of adenylyl cyclases by phorbol ester treatment. *J. Biol. Chem.* 268:3829-3832.
- Jaffé E.H., Urbina M., Ayala C. y Drujan B.D. (1987). Dopamine and noradrenaline content in fish retina: Modulation by serotonin. *J. Neurosci. Res.* 18:345-351.
- Janavs J.L., Pierce M.E. y Takahashi J.S. (1991). N-acetyltransferase and protein synthesis modulate melatonin production by Y79 human retinoblastoma cells. *Brain Res.* 540:138-144.
- Johansen P.A., Jennings I., Cotton R.G.H. y Kuhn D.M. (1996). Phosphorylation and activation of Tryptophan hydroxylase by exogenous protein kinase A. *J. Neurochem.* 66:817-823.
- Johnson J., Chen T.K., Rickman D.W., Evans C. y Brecha N.C. (1996). Multiple gamma-Aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 375:212-224.
- Kalloniatis M. y Fletcher E.L. (1993). Immunocytochemical localization of the amino acid neurotransmitters in the chicken retina. *J. Comp. Neurol.* 336:174-193
- Kalloniatis M. y Marc R.E. (1990) Interplexiform cells of the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 297:340-358.
- Kamermans M. y Werblin F. (1992). GABA-mediated positive autofeedback loop controls horizontal cell kinetics in tiger salamander retina. *J. Neurosci.* 12:2451-2463.
- Kaneda M., Hasimoto M. y Kaneko A. (1995). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors of ganglion cells in the cat retina. *Jpn. J. Physiol.* 45:491-508.
- Kaneko A. y Tachinaba M. (1986). Effects of gammaaminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina. *J. Physiol.* 373:443-461.
- Kato S., Teranishi T., Kuo C. y Negishi K. (1982). 5-Hydroxytryptamine stimulates [<sup>3</sup>H]dopamine release from the fish retina. *J. Neurochem.* 39:493-498.

- Kato S., Negishi K., Teranishi T. y Sugawara K. (1983). 5-Hydroxytryptamine: its facilitative action on [<sup>3</sup>H]dopamine release from the retina. *Vis. Res.* 23:445-449.
- Kawasaki I., Wakakura M. y Ishikawa S. (1996). Possible roles of AMPA/KA receptor in cultured Muller cells. *Jpn. J. Ophthalmol.* 40:158-66
- Kilbride P. y Ebrey T.G. (1979). Light-initiated changes of cyclic guanosine monophosphate levels in the frog retina measured with quick-freezing techniques. *J. Gen. Physiol.* 74:415-426.
- Kim K.S., Wessel T.C., Stone D.M., Carver C.H., Joh T.H. y Park D.H. (1991). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding tryptophan hydroxylase from rat central serotonergic neurons. *Mol. Brain Res.* 9:277-283.
- Kirsch M. y Wagner H.J. (1989). Release pattern of endogenous dopamine in teleost retina during light adaptation and pharmacological stimulation. *Vision Res.* 29:147-154.
- Klein D.C. y Kirk K.L. (1976). 2-Fluoro-L-histidine: a histidine analog which inhibits enzyme induction. En: "ACS Symposium Series n° 28: Symposium on Biochemistry involving carbonfluoride bonds". American Chemical Society, Washington D.C. pp. 35-56.
- Klein D.C. y Weller J.L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169:1093-1095.
- Klein D.C., Coon S.L., Roseboom P.H., Weller J.L., Bernard M., Gastel J.A., Zatz M., Iuvone P.M., Rodriguez I.R., Bégay V., Falcón J., Cahill G.M., Cassone V.M. y Baler R. (1997). The melatonin rhythm-generating enzyme: Molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Rec. Prog. Horm. Res.* 25:307-358.
- Kleinschmidt J., Zucker C.L. y Yazulla S. (1986). Neurotoxic action of kainic acid in the isolated toad and goldfish retina: I. Description of effects. *J. Comp. Neurol.* 251:181-195.
- Knapp A.G. y Dowling J.E. (1987) Dopamine enhances excitatory amino acid-gated conductances in cultured retinal horizontal cells. *Nature* 325:437-439.
- Knapp A.G., Schmidt K.F. y Dowling J.E. (1990) Dopamine modulates the kinetics of ion channels gated by excitatory amino acids in retinal horizontal cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87:767-771.

- Kolb H. y West R.W. (1977). Synaptic connections of the interplexiform cells in the retina of the cat. *J. Neurocytol.* 6:155-170.
- Kolb W., Cuenca N., Wang H.H. y Dekorver L. (1990). The synaptic organization of the dopaminergic amacrine cell in the cat retina. *J. Neurocytol.* 19:343-366.
- Kouyama N. y Marshak D.W. (1992). Bipolar cells specific for blue cones in the macaque retina. *J. Neurosci.* 12:1233-1252
- Kuhn D.M., Arthyr R. y States J.C. (1997). Phosphorylation and activation of brain tyrtophan hydroxylase: Identification of serine-58 as a substrate site for protein kinase A. *J. Neurochem.* 68:220-2223.
- Kumer S.C., Mockus S.M., Rucker P.J. y Vrana K.E. (1997). Amino-terminal analysis of tryptophan hydroxylase: protein kinase phosphorylation occurs at serine-58. *J. Neurochem.* 69:1738-1745.
- Lacey M.G., Mercuri N.B. y Borth R.A. (1987) Dopamine acts on D<sub>2</sub> receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J. Physiol.* 392:397-416.
- Laitinen J.T. y Saavedra J.M. (1990). The chick retinal melatonin receptor revisited: Localization and modulation of agonist binding with guanine nucleositides. *Brain Res.* 528:349-352.
- Lamb D.M.K., Frederick J.M., Hollyfield J.G., Sarthy V.P. y Marc R.E. (1982). Identification of neurotransmitter candidates in invertebrates and vertebrate photoreceptors. En: "*Visual cells in evolution*". Ed. Wesfall J.A. Raven Press. New York. pp. 65-80.
- Land M.F. y Fernald R.D. (1992). The evolution of eyes. *Annu. Rev. Neurosci.* 15:1-29.
- Larsen J.N. (1995). Somatostatin in the retina. *Acta Ophthalmol. Scand. Suppl.* 218:1-24.
- Lasater E.M. y Dowling J.E. (1985). Dopamine decreases conductance of the electrical junctions between cultured retinal horizontal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3025-3029.
- Laufer M. (1982). Electrophysiological studies of drug actions on horizontal cells. En: "*The S-Potencial*". Eds. B.D. Drujan y M. Laufer. Alan Liss, New York. pp. 257-279

- Laufer M. y Salas R. (1993). Modulation of electrical coupling of horizontal cells of the retina. *Acta Científica Venezolana*. 44:81-88.
- Laufer M., Negishi K. y Salas R. (1996). Effects of glutamic acid and related agents on horizontal cells in a marine teleost retina. *J. Neurosci. Res.* 44:568-576.
- Laurie D.J., Schoeffter P., Wiederhold K.H. y Sommer B. (1997). Cloning, distribution and functional expression of the human mGlu6 metabotropic glutamate receptor. *Neuropharmacology* 36:145-152.
- Leibovic K.N. (1986). A new method of non-enzymatic dissociation of the *Bufo* retina. *J. Neurosci. Methods* 15:301-306.
- Leino M., Aho I.M., Kari E., Gynther J. y Markkanen S. (1984). Effects of melatonin and 6-methoxy-tetrahydro- $\beta$ -carboline in light induced retinal damage: a computerized morphometric method. *Life Sci.* 35:1997-2001.
- Lerner A.B. Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H. y Mori W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80:2857-2858.
- Liapakis G., Politou E. y Thermos K. (1993). Solubilization of active somatostatin receptors from rabbit retina. *Biochem. Pharmacol.* 45:1821-1828.
- Lipton S.A., Aizenman E. y Loring R.H. (1987). Neural nicotinic acetylcholine responses in solitary mammalian retinal ganglion cells. *Pflügers Arch.* 410:37-43.
- Liu X. y Vrana K.E. (1991). Leucine zippers and coiled-coils in the aromatic amino acid hydroxylases. *Neurochem. Int.* 18:27-31.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lugo N. y Blanco R.E. (1997). Somatostatin-like immunoreactive cells in the ground squirrel retina. *Cell. Biol. Int.* 21:447-453
- Main C.M., Wilhelm M. y Gabriel R. (1993). Colocalization of GABA-immunoreactivity in neuropeptide- and monoamine-containing amacrine cells in the retina of *Bufo marinus*. *Arch. Histol. Cytol.* 56:161-166

- Makman M.H. y Dworkin B. (1986). Binding sites for [<sup>3</sup>H]SCH 23390 in retina: Properties and possible relationships to dopamine D<sub>1</sub>-receptors mediating the stimulation of adenylate cyclase. *Mol. Brain Res.* 11:261-270.
- Makman M.H., Dworkin B., Horowitz S.G. y Thal L.J. (1980). Properties of dopamine agonist and antagonist binding sites in mammalian retina. *Brain Res.* 194:403-418.
- Mans R.J. y Novelli G.D. (1961). Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter paper disc method. *Anal. Biochem.* 94:48-53.
- Marc R.E. y Lamb D.M.K. (1981). Glycinergic pathways in goldfish retina. *J. Neurosci.* 1:152-165.
- Marc R.E., Liu W.L.S., Kalloniatis M., Reiguel S.F. y Haesendonck E.V. (1990). Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina. *J. Neurosci.* 10:4006-4034.
- Marc R.E., Liu W.L.S., Scholtz K. y Muller J.F. (1988). Serotonergic and serotonin-accumulating neurons in the goldfish retina. *J. Neurosci.* 8:3427-3450.
- Markey K.A., Kondo S., Shenkman L. y Goldstein M. (1980). Purification and characterization of tyrosine hydroxylase from a clonal pheochromocytoma cell line. *Mol. Pharmacol.* 17:76-84.
- Masland R.H. y Mills J.W. (1979). Autoradiographic identification of acetylcholine in the rabbit retina. *J. Cell Biol.* 83:159-78.
- Masri H., Goureau O., Hecquet C., Simon A. y Nguyen-Legros J. (1996). Dopamine slows phagocytosis of rods from bovine pigment epithelium in vitro through D<sub>1</sub> receptor. *C. R. Acad. Sci. III.* 319:687-691
- Massey S.C. (1990). Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Prog. Retinal Res.* 9:399-425.
- Massey S.C. y Miller R.F. (1988). Glutamate receptors of ganglion cells in the rabbit retina: evidence for glutamate as a bipolar cell transmitter. *J. Physiol.* 405:635-655.
- Matthews G. y Watanabe S.I. (1988). Activation of single ion channels from toad retinal rod inner segments by cyclic GMP: Concentration dependence. *J. Physiol.* 403:389-405.

- Mazzucchelli C., Capsoni S., Angeloni D., Fraschini F. y Stankov B. (1996). Expression of the melatonin receptor in *Xenopus laevis*: a comparative study between protein and mRNA distribution. *J. Pineal Res.* 20:57-64
- McGonigle P., Wax M.B. y Molinoff P.B. (1988). Characterization of binding sites for [<sup>3</sup>H]spiroperidol in human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29:687-694.
- McMahon D.G. y Mattson M.P. (1996). Horizontal cell electrical coupling in the giant danio: synaptic modulation by dopamine and synaptic maintenance by calcium. *Brain Res.* 718: 89-96.
- Meek J.L. y Neff N.H. (1972). Tryptophan 5-hydroxylase: Approximation of half-life and rate of axonal transport. *J. Neurochem.* 19:1519-1525.
- Michaelis M.L., Johe K.K., Moghadam B. y Adams R.N. (1988). Studies on the ionic mechanism for the neuromodulatory actions of adenosine in the brain. *Brain Res.* 473:249-260.
- Miller R.J. y Kelly P.H. (1975). Dopamine-like effects of cholera toxin in the central nervous system. *Nature* 255:163-165.
- Miller R.F. y Schwartz E.A. (1983). Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina. *J. Physiol. (London)* 334:325-349.
- Mitchell C.K. y Redburn D.A. (1985). Analysis of pre- and postsynaptic factors of the serotonin system in rabbit retina. *J. Cell Biol.* 100:64-73.
- Mitchell C.K. y Redburn D.A. (1991). Melatonin inhibits ACh release from rabbit retina. *Visual Neurosci.* 7:479-483.
- Miwa S., Watanabe Y. y Hayaishi O. (1985). 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin as a regulator of dopamine and serotonin biosynthesis in rat brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 239:234-241.
- Mockus S.M., Kumer S.C. y Vrana K.E. (1997a). A chimeric tyrosine/tryptophan hydroxylase: the tyrosine hydroxylase regulatory domain serves to stabilize enzyme activity. *J. Mol. Neurosci.* 9:35-48.
- Mockus S. M, Kumer S.C. y Vrana K.E. (1997b). Carboxyl terminal deletion analysis of tryptophan hydroxylase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1342:132-140.

- Morgan I.G. (1992). What do amacrine cells do? *Retinal Res.* 11:193-214.
- Morgan I.G. y Ingham C.A. (1981). Kainic acid affects both plexiform layers of chicken retina. *Neurosci. Lett.* 21:275-280.
- Morizane C., Adachi K., Izumi F., Fujita Y., Akaike A., Kashii S. y Honda Y. (1997). N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester protects retinal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity *in vivo*. *European J. Pharmacol.* 328:45-49.
- Nagata H., Mimori Y., Nakamura S. y Kamayama M. (1984). Regional and subcellular distribution in mammalian brain of the enzymes producing adenosine. *J. Neurochem.* 42:1001-1007.
- Nagatsu T. y Ichinose H. (1991). Comparative studies on the structure of human tyrosine hydroxylase with those of the enzyme of various mammals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 98:203-210.
- Nagatsu T. Sawada M. y Yamaguchi T. (1983). Tryptophan hydroxylase system in brain tissue slices assayed by high-performance liquid chromatography. *Neurochem. Int.* 5:603-609.
- Nakata H. y Fujisawa H. (1982). Tryptophan 5-monoxygenase from mouse mastocytoma. *Eur. J. Biochem.* 124:595-601.
- Namboodiri M.A.A., Weller J.L. y Klein D.C. (1980). Evidence of inactivation of pineal indoleamine N-acetyltransferase by protein thiol:disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* 255:6032-6035.
- Namboodiri M.A.A., Fabilla J.T. y Klein D.C. (1981). Pineal N-acetyltransferase is inactivated by disulfide-containing peptides: insulin is the most potent. *Science* 213:571-573.
- Namboodiri M.A.A., Sugden D. y Klein D.C. (1983). 5-Hydroxytryptophan elevates serum melatonin. *Science* 221:659-660.
- Nash M.S. y Osborne N.N. (1995). Pertussis toxin-sensitive melatonin receptors negatively coupled to adenylate cyclase associated with cultured human and rat retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36:95-102.
- Nelson C.S., Marino J.L. y Allen C.N. (1996). Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport* 7:717-720.

- Nelson R., Famiglietti W.V. y Kolb H. (1978). Intracellular staining reveals different levels of stratification on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J. Neurophysiol.* 41:472-483.
- Nguyen-Legros J. (1988). Morphology and distribution of catecholamine-neurons in mammalian retina. *Prog. Retinal Res.* 7:113-147.
- Nguyen-Legros J., Simon A., Caille I. y Bloch B. (1997). Immunocytochemical localization of dopamine D<sub>1</sub> receptors in the retina of mammals. *Vis. Neurosci.* 14:545-551
- Nguyen-Legros J., Chanut E., Versaux-Borreri C., Simon A. y Trouvin J.H. (1996). Dopamine inhibits melatonin synthesis in photoreceptor cells through a D<sub>2</sub>-like receptor subtype in the rat retina: biochemical and histochemical evidence. *J. Neurochem.* 67:2514-2520.
- Nikaido S.S. y Takahashi J.S. (1989). Twenty-four hours oscillation of cAMP in chick pineal cells: role of cAMP in the acute and circadian regulation of melatonin production. *Neuron* 3:609-619.
- Nilsson S.F., De Neef P., Robberecht P. y Christophe J. (1994). Characterization of ocular receptors for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and their coupling to adenylate cyclase. *Exp. Eye Res.* 58:459-467
- Nomura A., Shigemoto R., Nakamura Y., Okamoto N., Mizuro N. y Nakanishi S. (1994). Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77:361-369
- Nordio M., Conte D., Nonaka K.O., Reiter R.J. y Isidore A. (1992). Failure to stimulate melatonin synthesis in the rat pineal gland with an adenosine analog. *Psychoneuroendocrinology* 17:249-254.
- Nowak J.Z. y Wawrocka M. (1993). Intravitreal application of membrane-permeable analogs of cyclic GMP increases serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity in retinas of light-exposed chicks: comparison with the effect of cyclic AMP analog and darkness. *Neurosci. Lett.* 162:21-24
- Nowak J.Z., Sek B. y Zurawska E. (1990). Activation of dopamine D-2 receptors in hen retina decreases forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation and serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity. *Neurochem Int.* 16:73-80.

- Nowak J.Z., Szymanska B., Zawilska J.B. y Bialek B. (1993). Hydroxyindole-O-methyltransferase activity in ocular and brain structures of rabbit and hen. *J. Pineal Res.* 15:35-42.
- Nowycky M.C., Fox A.P. y Tsien R.W. (1985). Novel mode of neuronal channel gating and its promotion by the dihydropyridine antagonist Bay K8644. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:2178-2182.
- Ogden T.E., Mascetti G.G. y Pierantoni R. (1985). The outer horizontal cell of the frog retina: morphology, receptor input, and function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26:643-656.
- Okamoto S., Okamura H., Terubayashi H., Akagi Y., Okamoto H. y Iyata Y. (1992). Localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) messenger RNA (mRNA) in amacrine cells of rat retina. *Curr. Eye Res.* 11:711-715
- Olcese J. y Moller M. (1989). Characterization of serotonin N-acetyltransferase activity in the retina of the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Neurosci. Lett.* 102:235-240.
- Olianas M.C., Ingianni A., Sogos V. y Onali P. (1997). Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors and PACAP in human fetal retina. *J. Neurochem.* 69:1213-1218
- Olney J.W. (1978). Neurotoxicity of excitatory amino acids. En: "*Kainic Acid as a tool in neurobiology*". Eds. E.G. McGeer, J.W. Olney y P.L. McGeer. Raven Press. New York pp. 95-122.
- Orr H.T., Lowry O.H., Cohen A.I. y Ferrendelli J.A. (1976). Distribution of 3':5'-cyclic AMP and 3':5'-cyclic GMP in rabbit retina in vivo: selective effects of dark and light adaptation and ischemia. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73:4442-4445.
- Osborne N.N. (1984). Indolamines in the eye with special reference to the serotonergic neurons of the retina. *Prog. Retinal Res.* 4:61-103.
- Osborne N.N. (1989). [<sup>3</sup>H]Glycogen hydrolysis elicited by adenosine in rabbit retina: involvement of A<sub>2</sub>-receptors. *Neurochem. Int.* 14:419-422.
- Osborne N.N. y Ghazi H. (1990). Agonist-stimulated inositol phospholipid hydrolysis in the mammalian retina. *Prog. Retinal Res.* 10:101-134.

- Osborne N.N. y Ghazi H. (1991). 5-HT<sub>1A</sub> receptors positively coupled to cAMP formation in the rabbit retina. *Neurochem. Int.* 19:1-10.
- Osborne N.N., McCord R.J. y Wood J. (1995). The effect of kainate on protein kinase C, GABA, and the uptake of serotonin in the rabbit retina in vivo. *Neurochem. Res.* 20:635-641.
- Osborne N.N., Wood J. y Groome N. (1994). The occurrence of three calcium-independent protein kinase C subspecies (delta, epsilon and zeta) in retina of different species. *Brain Res.* 637:156-162.
- Osborne N.N., Nicholas D.A., Dockray G.J. y Cuello A.C. (1982). Cholecystokinin and substance P immunoreactivity in retinas of rats, frogs, lizards and chicks. *Exp. Eye Res.* 34:630-649.
- Osborne N.N., Patel S., Terenghu G., Allen J.M., Polak J.M. y Bloom S.R. (1985). Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactive amacrine cells in retinas of frog and goldfish. *Cell Tiss. Res.* 241:651-656.
- Oswald T.J. y Steinberg R.H. (1980). Localization of frog reinal pigment epithelium Na, K-ATPase. *Exp. Eye Res.* 31:351-360.
- Oyster C.W., Takahashi E.S., Cilluffo M. y Brecha N.M. (1985). Morphology and distribution of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the cat retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:6335-6339.
- Paes de Carvalho R. y de Mello F.G. (1982). Adenosine-elicited accumulation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the chick embryo retina. *J. Neurochem.* 38:493-500.
- Paes de Carvalho R., Braas K.M., Snyder S.H. y Adler R. (1990). Analysis of adenosine immunoreactivity, uptake and release in purified cultures of developing chick embryo retinal neurons and photoreceptors. *J. Neurochem.* 55:1603-1611.
- Pakinson D. y Randon R.R. (1983). Effects of light on dopamine metabolism in the chick retina. *J. Neurochem.* 40:39-46.
- Pan Z.H. y Lipton S.A. (1995). Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals. *J. Neurosci.* 15:2668-2679.
- Pang S.F. y Yew D.T. (1979). Pigment aggregation by melatonin in the retinal pigment epithelium and choroid of Guinea pigs, *Cavia pocellus*. *Experientia* 35:321-233.

- Peng Y.W., Blanckstone C.W., Haganir R.L. y Yau K.W. (1995). Distribution of glutamate receptor subtypes in the vertebrate retina. *Neuroscience* 66:483-497.
- Peng Y.W., Sharp A.H., Snyder S.H. y Yau K.W. (1991). Localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in synaptic terminals in the vertebrate retina. *Neuron* 6:525-531.
- Pérez M.T.R. y Bruun A. (1987). Colocalization of [<sup>3</sup>H]-adenosine accumulation and GABA immunoreactivity in the chicken and rabbit retinas. *Histochemistry* 87:413-417.
- Pérez M.T.R. y Davanger S. (1994). Distribution of GABA immunoreactivity in kainic acid-treated rabbit retina. *Exp. Brain Res.* 100:227-238.
- Pérez M.T.R. y Ehinger B. (1989). Multiple neurotransmitter systems influence the release of adenosine derivatives from the rabbit retina. *Neurochem. Int.* 15:411-420.
- Pérez M.T.R. y Ehinger B. (1990). Inhibition of acetylcholine release from the rabbit retina by adenosine analogues. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci. (Suppl.)* 31:534.
- Pérez M.T.R., Arnér K. y Ehinger B. (1988). Stimulation-evoked release of purines from the rabbit retina. *Neurochem. Int.* 13:307-318.
- Pérez M.T.R., Arnér K. y Hakansson A. (1997). DNA fragmentation characteristic of apoptosis and cell loss induced by kainic acid in rabbit retinas. *Neurochem. Int.* 31:251-260.
- Pérez M.T.R., Ehinger B., Lindström K. y Fredholm B.B. (1986). Release of endogenous and radioactive purines from the rabbit retina. *Brain Res.* 398:106-112.
- Pérez M.T.R., Larsson B., Alm P., Andersson K.E. y Ehinger B. (1995). Localization of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity in rat and rabbit retinas. *Exp. Brain Res.* 104:207-217.
- Pfister C., Bennett N., Bruckert F., Catty P., Clerc A., Pagès F. y Deterre P. (1993). Interactions of a G-protein with its effector: transducin and cGMP phosphodiesterase in retinal rods. *Cell Signalling* 5:235-251.
- Phillips E. y Newsholme E.A. (1979). Maximum activities, properties and distribution of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in rat and human brain. *J. Neurochem.* 33:553-558.

- Pierce M.E. y Besharse J.C. (1987). Melatonin and rhythmic photoreceptor metabolism: melatonin-induced cone elongation is blocked by high light intensity. *Brain Res.* 405:400-404.
- Pierce M.E., Barker D., Harrington J. y Takahashi J.S. (1989). Cyclic AMP-dependent melatonin production in Y79 human retinoblastoma cells. *J. Neurochem.* 53:307-310.
- Plagemann P.G.W. y Wohlhueter R.M. (1983). Nucleoside transport in mammalian cells and interaction with intracellular metabolism. En: "*Regulatory function of Adenosine*". Eds. Berne R.M., Rall T.W. y Rubio R. Martinus Nijhoff Publishers. La Haya. pp. 179-201.
- Polans A., Hutchins J.B. y Werblin F.S. (1985). Muscarinic cholinergic receptors in the retina of the larval tiger salamander. *Brain Res.* 340:335-362.
- Pollard J. y Eldred W.D. (1990). Synaptic analysis of amacrine cells in the turtle retina which contain tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity. *J. Neurocytol.* 19:53-66.
- Poncet L., Denoroy L. y Jouvet M. (1993). Daily variations in *in vivo* tryptophan hydroxylation and in the content of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in discrete brain areas of the cat. *J. Neural Transm.* 34:137-150.
- Pourcho R.G. y Goebel D.J. (1985). A combined Golgi and autoradiographic study of [<sup>3</sup>H]glycine-accumulating amacrine cells in the cat retina. *J. Comp. Neurol.* 233:473-480.
- Pourcho R.G. y Goebel D.J. (1990). Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine-containing neurons in the retina. En: "*Glycine transmission*". Ed. Ottersen O.P. y Storm-Mathisen. John Wiley and Sons Ltd. Chochester UK. pp. 355-389.
- Qian H. y Dowling J.E. (1995). GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors on hybrid bass retinal bipolar cells. *J. Neurophysiol.* 74:1920-1928.
- Quay W.B. (1965). Retinal and pineal hydroxyindole-O-methyltransferase activity in vertebrates. *Life Sci.* 4:983-991.
- Radwing R.S. Hutchison V.H. (1992). Influence of temperature and photoperiod on plasma melatonin in the mudpuppy, *Necturus maculosus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88:364-374.
- Ramón y Cajal S. (1892). "*La retina des vertebrates*". Eds. Thorpe S. y Glickstein M., 1972. Springfield.

- Raunen T. y Kanner B.I. (1994). Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retina. *Neurosci. Lett.* 169:137-140.
- Rayborn M.E., Sarthy P.V., Lam D.M.K. y Hollyfield J.G. (1981). The emergence, localization and maturation of neurotransmitter systems during development of the retina in *Xenopus laevis*. II. Glycine. *J. Comp. Neurol.* 195:585-593.
- Redburn D.A., Clement-Cormier Y. y Lam D.M.K. (1980). Dopamine receptors in the goldfish retina: <sup>3</sup>H-spiroperidol and <sup>3</sup>H-domperidone binding; and dopamine-stimulated adenylate cyclase activity. *Life Sci.* 27:23-31.
- Redburn D.A. y Mitchell C.K. (1989). Darkness stimulates rapid synthesis and release of melatonin in rat retina. *Visual. Neurosci.* 3:391-403
- Rees D.C., Lewis M. y Lipscomb W.N. (1983). Refined crystal structure of carboxypeptidase A at 1.54 Å resolution. *J. Molec. Biol.* 168:367-387.
- Reichenbach A. y Robinson S.R. (1995). The involvement of Müller cells in the outer retina. En: "Neurobiology of the vertebrate outer retina". Eds. Kettenmann H. y Ransom B. Academic Press. New York.
- Reppert S.M., Weaver D.R. y Godson C. (1996). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 17:100-102.
- Rickman D.W., Blanks J.C. y Brecha N.C. (1996). Somatostatin-immunoreactive neurons in the adult rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 365:491-503.
- Rodieck R.W. (1973). Visual pigments: bleaching and regeneration. En: "The vertebrate retina. Principles of structure and function". Eds. Kennedy D. y Park R.B. Freeman and Company. San Francisco. Cap. VIII. pp. 199-237.
- Rohlich P., Szel A. y Papermaster D.S. (1989). Immunocytochemical reactivity of *Xenopus laevis* retinal rods and cones with several monoclonal antibodies to visual pigments. *J. Comp. Neurol.* 290:105-117.
- Rohrer B. y Stell W.K. (1995). Localization of putative dopamine D<sub>2</sub>-like receptors in the chick retina, using in situ hybridization and immunocytochemistry. *Brain Res.* 695:110-116.

- Roseboom P.H., Coon S.L., Baler R., McCune S.K., Weller J.L. y Klein D.C. (1996). Melatonin synthesis: analysis of the >150 fold-increase in serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137:3033-3044.
- Rubio R., Bencherif M. y Berne R.M. (1989). Inositol phospholipid metabolism during and following synaptic activation: role of adenosine. *J. Neurochem.* 52:197-806.
- Sahel J.A., Albert D.M., Lessell S., Adler H., McGee T.L. y Konrad-Rastegar J. (1991). Mitogenic effects of excitatory amino acids in the adult rat retina. *Exp. Eye Res.* 53: 657-64.
- Saito H.A. (1983). Morphology of physiology identified X-, Y-, and W-type retinal ganglion cells of the cat. *J. Comp. Neurol.* 221:279-288.
- Sassoe-Pognetto M., Wassle H. y Grunert U. (1994). Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: Cone bipolar cells express the  $\alpha 1$  subunit of the glycine receptor. *J. Neurosci.* 14:5131-5146.
- Sawada M. y Nagatsu T. (1986). Stimulation of the serotonin autoreceptor prevents the calcium-calmodulin-dependent increase of serotonin biosynthesis in rat raphe slices. *J. Neurochem.* 46:963-967.
- Sawada M. y Nagatsu T. (1988). Tryptophan hydroxylase activity in brain slices. *Int. J. Biochem.* 20:1033-1038.
- Saxen L. (1954). The development of the visual cells. *Ann. Acad. Sci. Fen. A* 23:5-93.
- Schmidt K.F. (1995). Protein kinase C does not mediate the dopamine-dependent modulation of glutamate receptors in retinal horizontal cells of the perch (*Perca fluviatilis*). *Vision Res.* 36:3939-3942
- Schmidt Y. y Witkovsky P. (1996). Glutamate release by the intact light-responsive photoreceptors layer of the *Xenopus laevis*. *J. Neurosci. Methods* 68:55-60.
- Schofield J.G. (1983). Use of a trapped fluorescent indicator to demonstrate effects of throliberin and dopamine on cytoplasmic calcium concentrations in bovine anterior pituitary cells. *FEBS Lett.* 159:79-82.

- Schorderet M. (1982). Pharmacological characterization of adenosine-mediated increase in cyclic AMP in isolated rabbit retina. *Fed. Proc.* 41:1707.
- Schubert P. (1988). Physiological modulation by adenosine: selective blockade of A<sub>1</sub>- receptors with DPCPX enhances stimulus train-evoked neuronal Ca<sup>2+</sup> influx in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 458:162-165.
- Schütte M. y Schlemmermeyer P. (1993). Depolarization elicits, while hyperpolarization blocks uptake of endogenous glutamate by retinal horizontal cells of the turtle. *Cell Tissue Res.* 274:553-558
- Schütte M. y Witkovsky P. (1990). Serotonin-like immunoreactivity in the retina of the clawed frog *Xenopus laevis*. *J. Neurocytol.* 19:504-518.
- Schütte M. y Witkovsky P. (1991). Dopaminergic interplexiform cells and centrifugal fibers in the *Xenopus laevis* retina. *J. Neurocytol.* 20:195-207.
- Schwartz E.A. (1987). Depolarization without calcium can release  $\gamma$ -aminobutyric acid from retinal neuron. *Science* 238:350-355.
- Schwarcz R. y Coyle J.T. (1977). Kainic acid: Neurotoxic effects after intraocular injection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16:141-148.
- Shein H.M. y Wurtman R.J. (1971). Stimulation of <sup>14</sup>C-tryptophan 5-hydroxylation by norepinephrine and dibutyl adenosine 3',5'-monophosphate in rat pineal organ cultures. *Life Sci.* 10:935-940.
- Sherry D.M., Micich A. y Yazulla S. (1993). Glycine in the lizard retina: comparison to the GABA system. *Vis. Neurosci.* 10:693-702
- Shibuya H., Toru M. y Watanabe S. (1978). A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. *Brain Res.* 138:364-368.
- Shimizu H., Daly J.W. y Creveling (1969). A radiosiotopic method for measuring the formation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in incubated slices of brain. *J. Neurochem.* 16:1609-1619.
- Sitaram B.R. y Lees G.J. (1978). Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J. Neurochem.* 31:1021-1026.

- Sitaram B.R. y Lees G.J. (1984). Effect of oxygen on the induction tryptophan hydroxylase by adrenergic agents in organ cultures of pineal glands. *J. Neurochem.* 42:1183-1185.
- Sitaramayya A., Lombardi L. y Margulis A. (1993). Influence of dopamine on cyclic nucleotide enzymes in bovine retinal membrane fractions. *Visual Neurosci.* 10:991-996.
- Slaughter M.M. y Miller R.F. (1983). The role of excitatory aminoacid transmitters in the mudpuppy retina: an analysis with kainic acid and N-methylaspartate. *J. Neurosci.* 3:1701-1711.
- Slaughter M.M. (1995). GABA<sub>B</sub> receptors in the vertebrate retina. *Prog. Retinal Res.* 10:293-312.
- Smiley J.F. y Basinger S.F. (1988). Somastotatin-like immunoreactivity and glycine high affinity uptake colocalize to and interplexirm cell of the *Xenopus laevis* retina. *J. Comp. Neurol.* 274:608-618.
- Smiley J.F. y Basinger S.F. (1989). Glycine high-affinity uptake labels a supopulation of somastatin-like immunoreactive cells in the *Rana pipiens* retina. *Brain Res.* 495:31-44.
- Smiley J.F. y Basinger S.F. (1990). Glycine stimultes calcium-independent release of [<sup>3</sup>H]GABA from isolated retinas of *Xenopus laevis*. *Vis. Neurosci.* 4:337-348.
- Smiley J.F. y Yazulla S. (1990). Glycinergic contacts in the outer plexiform layer of the *Xenopus laevis* retina characterized by antibodies to glycine, GABA, and glycine receptors. *J. Comp. Neurol.* 299:375-388.
- Steinlechner S., Steger R.W., King T.S. y Reiter R.J. (1983). Diurnal variations in the serotonin content and turnover in the pineal gland of the syrian hamster. *Neurosci. Lett.* 35:167-172.
- Stenkamp D.L., Iuvone P.M. y Adler R. (1994). Photomechanical movements of cultured embryonic photoreceptors: Regulation by exogenous neuromodulators and by a regulable source of endogenous dopamine. *J. Neurosci.* 14:3083-3096.
- Stoll J., Kozak C.A. y Goldman D. (1990). Characterization and chromosomal mapping of a cDNA encoding tryptophan hydroxylase from a mouse mastocytoma cell line. *Genomics* 7:88-96.

- Stone S., Witkovsky P. y Schütte M. (1990). A chromatic horizontal cell in the *Xenopus* retina: Intracellular staining and synaptic pharmacology. *J. Neurophysiol.* 64:1683-1694.
- Straznicky C. y Hiscock J. (1994). Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the retina of two Australian lizards. *Arch. Histol. Cytol.* 57:151-160.
- Studholme K.M. y Yazulla S. (1997). <sup>3</sup>H-adenosine uptake selectively labels rod horizontal cells in goldfish retina. *Visual Neurosci.* 14:207-12.
- Sudgen D., Grady R. J. y Mefford O.N. (1989). Measurement of tryptophan hydroxylase activity in rat pineal glands and pinealocytes using an HPLC assay with electrochemical detection. *J. Pineal Res.* 6:285-292.
- Sumi M., Kiuchi K., Ishikawa T., Ishii A., Hagiwara M., Nagatsu T. y Hidaka H. (1991). The newly synthesized selective Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 968-975.
- Tachibana M. y Okada T. (1991). Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina. *J. Neurosci.* 11:2199-2208.
- Takahashi K.I. y Copenhagen D.R. (1992). APB supresses synaptic input to retinal horizontal cells in fish: a direct action on horizontal cells modulated by intracellular pH. *J. Neurophysiol.* 67:1633-1642.
- Takahashi K.B., Miyoshi S. y Kaneko A. (1995). GABA-induced chloride current in catfish horizontal cells mediated by non-GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Jpn. J. Physiol.* 45: 437-456.
- Tappaz M.L. y Pujol J.F. (1980). Estimation of the rate of tryptophan hydroxylation *in vivo*: a sensitive microassay in discrete rat brain nuclei. *J. Neurochem.* 34:933-40.
- Tauchi M., Madigan N.K. y Masland R.H. (1990). Shapes and distributions of the catecholamine-accumulating neurons in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 293:178-189.
- Terasawa M., Hagiwara M., Hachiya T., Kobayashi R., Obata S., Wakabayashi T. y Hidaka H. (1991). Identification and characterization of protein kinase C-related enzymes in frog retina. *Arch. Biochem. Biophys.* 287:213-217.

- Thibault C., Falcón J., Greenhouse S.S., Lowery C.A., Gern W.A. y Collin J.P. (1993). Regulation of melatonin production by pineal photoreceptor cells: role of cyclic nucleotides in the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Neurochem.* 61:332-339
- Thomas K.B., Zawilska J. y Iuvone P.M. (1990). Arylalkylamine (serotonin) N-acetyltransferase assay using high performance liquid chromatography with fluorescence or electrochemical detection of N-acetyltryptamine. *Anal. Biochem.* 184:228-234.
- Thomas K.B. y Iuvone P.M. (1991). Circadian rhythm of tryptophan hydroxylase activity in chicken retina. *Cell Mol. Neurol.* 11:511-527.
- Thomas K.B., Tigges M. y Iuvone P.M. (1993). Melatonin synthesis and circadian tryptophan hydroxylase activity in chicken retina following destruction of serotonin immunoreactive amacrine and bipolar cells by kainic acid. *Brain Res.* 601:303-307.
- Tipper J.P., Criton B.A., Ribeiro P. y Kaufman S. (1994). Cloning and expression of rabbit and human brain tryptophan hydroxylase cDNA in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 315:445-453.
- Tong J.H. y Kaufman S. (1975) Tryptophan hydroxylase: purification and some properties of the enzyme from rabbit hindbrain. *J. Biol. Chem.* 250:4152-4158.
- Törk I. y Stone J. (1979). Morphology of catecholamine-containing amacrine cells in the cat's retina, as seen in retinal whole mounts. *Brain Res.* 169:261-273.
- Tosini G. y Menaker M. (1996). Circadian rhythm in cultured mammalian retina. *Science* 272:419-421
- Tóth P. y Straznický C. (1989). Biplexiform ganglion cells in the retina of *Xenopus laevis*. *Brain Res.* 499:378-382.
- Townes-Anderson E. y Vogt B.A. (1989). Distribution of muscarinic acetylcholine receptors on processes of isolated retinal cells. *J. Comp. Neurol.* 290:369-383.
- Traina G., Fontanesi G. y Bagnoli P. (1994). Maturation of somatostatin immunoreactivity in the pigeon retina: morphological characterization and quantitative analysis. *Vis. Neurosci.* 11:165-177.

- Tsukamoto Y. (1987). Morphometrical features of rod outer segments in relation to visual acuity and sensitivity in the retina of *Rana catesbeiana*. *Zool. Sci.* 4:233-242.
- Uchida K. y Iuvone P.M. (1997) Intracellular calcium concentrations of cultured photoreceptor cells: sustained elevation in depolarized cells and effects of calmodulin kinase inhibitors. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 38:S615.
- Uchiyama H., Reh T.A. y Stell W.K. (1988). Immunocytochemical and morphological evidence for a retinopetal projection in anuran amphibians. *J. Comp. Neurol.* 274:48-59.
- Underwood H., Binkley S. Siopes T. y Mosher K. (1984). Melatonin rhythms in the eyes, pineal bodies, and blood of japonese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 56:70-91.
- Underwood H. y Siopes T. (1985). Melatonin rhythms in quail: Regulation by photoperiod and circadian pacemakers. *J. Pineal Res.* 2:133-143.
- Undie A.S. y Friedman E. (1990). Stimulation of a dopamine D<sub>1</sub> receptor enhances inositol phosphates formation in rat brain. *J. Pharmacol. Expl. Ther.* 253:987-992.
- Unger W.G., Botler J.M., Cole D.F., Bloom S.R. y McGregor G.P. (1981). Substance P, vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and somatostatin levels in ocular tissue of normal and sensorily denervated rabbit retina. *Exp. Eye Res.* 32:797-803.
- Urbina M., Schmeer C. y Lima L. (1996). 5HT<sub>1A</sub> receptor agonist differentially increases cyclic AMP concentration in intact and lesioned goldfish retina. *In vitro* inhibition of outgrowth by forskolin. *Neurochem. Int.* 29:453-460.
- Valencia A.M., Prieto J.C. y Arilla E. (1992). Somatostatin binding and modulation of adenylate cyclase in ovine retina membranes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 88:111-117.
- Vallar L. y Meldolesi J. (1989). Mechanism of signal transduction at the dopamine D<sub>2</sub> receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 10:74-77.
- Van Calker D., Müller M. y Hamprecht B. (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* 33:999-1005.

- Vanecek J. y Klein D.C. (1995). Melatonin inhibition of GnRH-induced LH release from neonatal rat gonadotroph: Involvement of  $Ca^{2+}$  nor cAMP. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 269:E85-E90.
- Vaney D.I. y Whittington G.E. (1986). Substance P-immunoreactive amacrine cells in cat retina. *Soc. Neurosci. Abst.* 12:177.9
- Vaney D.I. y Young H.M. (1988). GABA-like immunoreactivity in cholinergic amacrine cells of the rabbit retina. *Brain Res* 438:369-373.
- Vardi N. y Sterling P. (1993) Subcellular localization of GABA<sub>A</sub> receptor on bipolar cells in macaque and human retina. *Vision Res.* 34:1235-1246.
- Veruki M.L. y Wassle H. (1996). Immunohistochemistry localization of dopamine D<sub>1</sub> receptors in rat retina. *Eur. J. Neurosci.* 8:2286-2297.
- Veruki M.L. y Yeh H.H. (1992). Vasoactive intestinal polypeptide modulates GABA<sub>A</sub> receptor function in bipolar cells and ganglion cells of the rat retina. *J. Neurophysiol.* 67:791-797.
- Villani L., Carrazo S. y Guarnieri T. (1995). 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione but not MK-801 exerts a protective effect against kainic acid neurotoxicity in the goldfish retina. *Neurosci. Lett.* 192:127-131.
- Vinores S.A. (1995). Assessment of blood-retinal barrier integrity. *Histol. Histopath.* 10:141-154.
- Voaden M.J., Marshall J. y Murani N. (1974). The uptake of [<sup>3</sup>H]γ-aminobutyric acid and [<sup>3</sup>H]glycine by isolated retina of the frog. *Brain Res.* 67:115-132.
- Voigh T. (1986). Cholinergic amacrine cells in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 248:19-35.
- Vorwerk C.K., Kreutz M.R., Dreyer E.B. y Sabel B.A. (1996). Systemic L-kynurenine administration partially protects against NMDA, but not kainate-induced degeneration of retinal ganglion cells, and reduces visual discrimination deficits in adults rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:2382-2392.
- Vrana K.E., Rucker P.J. y Kumer S.C. (1994). Recombinant rabbit tryptophan hydroxylase is a substrate for cAMP-dependent protein kinase. *Life Sci.* 55:1045-1052.

- Wagner H.J. y Behrens U.D. (1993). Microanatomy of the dopaminergic system in the rainbow trout retina. *Vis. Res.* 33:1345-1358.
- Wagner H.J. y Zeutsius I. (1987). Amacrine cells with neurotensin- and somatostatin-like immunoreactives in three species of teleosts with different color vision. *Cell Tiss. Res.* 76:663-673.
- Wainwright S.D. (1979). Development of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the retina of the chick embryo and young chick. *J. Neurochem.* 32:1099-1101.
- Wainwright S.D. y Wainwright L.K. (1984a). Relationship between cycles in levels of serotonin N-acetyltransferase activity and cyclic GMP content of cultured chick pineals. *J. Neurochem.* 43:358-363.
- Wainwright S.D. y Wainwright L.K. (1984b). Phase-shifting of cycles in level of serotonin N-acetyltransferase activity and cyclic GMP content of cultured chick pineal glands by methotrexate. *J. Neurochem.* 43:364-370.
- Wässle H. y Chun M.H. (1988). Dopaminergic and indoleamine-accumulating amacrine cells express GABA-like immunoreactivity in the retina. *J. Neurosci.* 18:118-120.
- Wässle H., Grunert U., Martin P.R. y Boycott B.B. (1994). Immunocytochemical characterization and spatial distribution of midget bipolar cells in the macaque monkey retina. *Vision Res.* 34:561-579
- Watanabe S.I. y Matthews G. (1988). Regional distribution of cGMP-activated ion channels in the plasma membrane of the rod photoreceptor. *J. Neurosci.* 8:2334-2337.
- Watkins J.C. y Evans R.H. (1981). Excitatory amino acid transmitter. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21:165-204.
- Watt C.B. (1989). Synaptic organization of enkephalin-like-immunoreactive amacrine cells in the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 283:333-341.
- Watt C.B. (1992). A double-label study demonstrating that all serotonin-like immunoreactive amacrine cells in the larval tiger salamander retina express GABA-like immunoreactivity. *Brain Res.* 583:336-339.

- Watt C.B. y Florack V.J. (1991a). A double-label study demonstrating that enkephalin and somatostatin are localized in separate populations of amacrine cells in the larval tiger salamander retina. *Neurosci. Lett.* 133:86-88.
- Watt C.B. y Florack V.J. (1991b). Double-label analyses demonstrating the non-coexistence of enkephalin and glycine in amacrine cells of the larval tiger salamander retina. *Brain Res.* 562:154-158.
- Watt C.B. y Florack V.J. (1993a). Colocalization of glycine in substance P-amacrine cells of the larval tiger salamander retina. *Vis. Neurosci.* 10:899-906
- Watt C.B. y Florack V.J. (1993b). Double-label analyses of the coexistence of somatostatin with GABA and glycine in amacrine cells of the larval tiger salamander retina. *Brain Res.* 617:131-137.
- Watt C.B. y Florack V.J. (1993c). Colocalization of enkephalin and glycine in amacrine cells of the chicken retina. *Brain Res.* 628:349-355.
- Watt C.B. y Florack V. J. (1994). A triple-label analysis demonstrating that enkephalin-, somatostatin-, and neurotensin-like immunoreactivities are expressed by a single population of amacrine cells in the chicken retina. *Brain Res.* 634:310-316.
- Watt C.B. y Glazebrook P.A. (1994). Interaction between enkephalin and  $\gamma$ -aminobutyric acid in the chicken retina: A double-label immunoelectron microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 342:378-388.
- Watt C.B. y Wilson E.A. (1990). Synaptic organization of serotonin-like immunoreactive amacrine cells in the larval tiger salamander retina. *Neuroscience* 35:715-723.
- Watt C.B., Florack V.J. y Walker R.B. (1993). Quantitative analysis of the coexistence of gamma-aminobutyric acid in substance P amacrine cells of the larval tiger salamander retinas. *Brain Res.* 603:111-116.
- Watt C.B., Glazebrook P.A. y Florack V.J. (1994). Localization of substance P and GABA in retinotectal ganglion cells of the larval tiger salamander. *Vis. Neurosci.* 11:355-362.
- Watt C.B., Li H.B., Fry K.R. y Lam D.M.K. (1985). Localization of enkephalin-like immunoreactive amacrine cells of the chicken retina. *Brain Res.* 348:187-191.

- Watt C.B., Yang S.Z., Lam D.M.K. y Wu S.M. (1988). Localization of tyrosine-hydroxylase-like immunoreactive amacrine cells in the larval tiger salamander retina. *J. Comp. Neurol.* 272:114-126.
- Wei X.Y., Rutledge A., Zhong Q., Ferrante J. y Triggler D.J. (1989). Ca<sup>2+</sup> channels in chick neural retina cells characterized by 1,4-dihydropyridine antagonists and activators. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67:506-514.
- Wiechmann A.F. (1996). Hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA expression in a subpopulation of photoreceptors in the chicken retina. *J. Pineal Res.* 20:217-225.
- Wiechmann A.F. y Craft C.M. (1993). Localization of mRNA encoding the indolamine synthesizing enzyme, hydroxyindole-O-methyltransferase, in chicken pineal gland and retina by *in situ* hybridization. *Neurosci. Lett.* 150:207-211.
- Wiechmann A.F. y O'Steen W.K. (1992). Melatonin increases photoreceptor susceptibility to light-induced damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33:1894-1902.
- Wiechmann A.F. y Wirsig-Wiechmann C.R. (1991). Localization and quantification of high-affinity melatonin binding sites in *Rana pipiens* retina. *J. Pineal Res.* 10:174-179.
- Wilhelm M., Zhu B., Gábel R. y Straznický C. (1993). Immunocytochemical identification of serotonin-synthesizing neurons in the vertebrate retina: A comparative study. *Exp. Eye Res.* 56:213-240.
- Williams P., McVicar B. y Pittman Q. (1990) Synaptic modulation by dopamine of calcium currents in rat pars intermedia. *Neuroscience* 31:673-681.
- Witkovsky P., Yang C.Y. y Ripps H. (1981). Properties of blue-sensitive rod in the *Xenopus* retina. *Vision Res.* 21:875-883.
- Witkovsky P. y Schütte M. (1991). The organization of dopaminergic neurons in vertebrate retinas. *Vis. Neurosci* 7:113-124.
- Witkovsky P., Stone S. y McDonald E.D. (1988a) Morphology and synaptic connections of HRP-filled axon-bearing horizontal cells in the *Xenopus* retina. *J. Comp. Neurol.* 275:29-38.

- Witkovsky P., Stone S. y Besharse J.C. (1988b). The effects of dopamine and related ligands on photoreceptor to horizontal cells transfer in the *Xenopus* retina. *Biomed. Res. Suppl.* 9:93-107.
- Witkovsky P., Zhang J. y Blam O. (1994). Dopaminergic neurons in the retina of *Xenopus laevis*: amacrine vs. interplexiform subtypes and relation to bipolar cells. *Cell. Tiss. Res.* 278:45-56.
- Witkovsky P., Gabriel R., Krizaj D. y Akopian A. (1995). Feedback from luminosity horizontal cells mediates depolarizing responses of chromaticity horizontal cells in the *Xenopus* retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:3556-3560
- Witkovsky P., Nicholson C., Rice M.E., Bohmaker K. y Meller E. (1993). Extracellular dopamine concentration in the turtle retina of the clawed frog, *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5667-5771.
- Woodruff M.L. y Bownds M.D. (1979). Amplitude, kinetics and reversibility of a light-induced decrease in guanosine 3':5'-cyclic monophosphate in frog photoreceptor membranes. *J. Gen. Physiol.* 73:629-653.
- Woodruff M.L. y Fain G.L. (1982). Ca<sup>2+</sup>-dependent changes in cyclic GMP levels are not correlated with opening and closing of the light-dependent permeability of toad photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 80:537-555
- Wrong-Riley M.T.T. (1974). Synaptic organization of the inner plexiform layer in the tiger salamander. *J. Neurocytol.* 3:1-33.
- Wu S.M. (1991). Signal transmission and adaptation-induced modulation of photoreceptor synapses in the retina. *Prog. Retinal Res.* 10:27-44.
- Wülle I. y Wagner H.J. (1990). GABA and tyrosine hydroxylase immunocytochemistry reveal different patterns of colocalization in retinal neurons of various vertebrates. *J. Comp. Neurol.* 296:173-178.
- Yang X.J. y Kaufman S. (1994). High-level expression and deletion mutagenesis of human tryptophan hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:6659-6663.
- Yang J.H. y Wu S.M. (1997). Characterization of glutamate transporter function in the tiger salamander retina. *Vision Res.* 37:827-838

- Yau K.W. y Baylor D.A. (1989). Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Ann. Rev. Neurosci.* 12:289-327.
- Yazejian B. y Fain G.L. (1992). Excitatory amino acid receptors on isolated retinal ganglion cells from the goldfish. *J. Neurophysiol.* 67:94-104.
- Yazulla S. y Kleinschmidt J. (1980). The effects of intraocular injection of kainic acid on the synaptic organization of the goldfish retina. *Brain Res.* 182:287-301.
- Yazulla S. y Kleinschmidt J. (1982). Dopamine blocks carrier-mediated release of GABA from retinal horizontal cells. *Brain Res.* 233:211-215.
- Yazulla S. y Zucker C.L. (1988). Synaptic organization of dopaminergic interplexiform cells in the goldfish retina. *Vis. Neurosci.* 1:13-29.
- Xia Z., Choi E.J., Wang F. y Storm D.R. (1992). The type III calcium/calmodulin-sensitive adenylyl cyclase is not specific to olfactory sensory neurons. *Neurosci. Lett.* 144:169-173.
- Xia Z., Choi E.J., Wang F., Blazynski C. y Storm D.R. (1993). Type I calmodulin-sensitive adenylyl cyclase is neural specific. *J. Neurochem.* 60:305-311.
- Zafra F., Aragon C., Olivares L., Danbolt N.C., Gimenez C. y Storm-Mathisen J. (1995). Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J. Neurosci.* 15:3952-3969.
- Zarbin M.A., Wamsley J.K., Palacio J.M. y Kuhar M.J. (1986). Autoradiographic localization of high affinity GABA, benzodiazepine, dopaminergic, adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in the rat, monkey and human retina. *Brain Res.* 374:75-92.
- Zatz M. y Romero J.A. (1978). Effects of calcium-free medium on the induction of serotonin N-acetyltransferase in the rat pineal. *Biochem. Pharmacol.* 27:2549-2553.
- Zatz M. y Mullen D.A. (1988). Photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells II. Effects of forskolin, 8-Bromocyclic AMP, and 8-Bromocyclic GMP on the melatonin rhythm. *Brain Res.* 453:51-62.
- Zawilska J.B. y Iuvone P.M. (1989). Catecholamine receptors regulating serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin content of chicken retina and pineal gland: D<sub>2</sub>-dopamine receptors in the retina and alpha-2-adrenergic receptors in pineal gland. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250:86-92.

- Zawilska J.B. y Nowak J.Z. (1992). Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem. Int.* 135:71-74.
- Zawilska J.B. y Iuvone P.M. (1992). Melatonin synthesis in chicken retina: Effect of kainic acid-induced lesions on the diurnal rhythm and D<sub>2</sub> dopamine receptor-mediated regulation of serotonin N-acetyltransferase activity. *Neurosci. Lett.* 135:71-74.
- Zawilska J.B., Derbiszewska T., Sek B. y Nowak J.Z. (1995). Dopamine-dependent cyclic AMP generating system in chick retina and its relation to melatonin biosynthesis. *Neurochem. Int.* 27:535-543.
- Zawilska J.B. y Wawrocka M. (1993). Chick retina and pineal gland differentially respond to constant light and darkness: in vivo studies on serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity and melatonin content. *Neurosci. Lett.* 153:21-24.
- Zeevalk G.D. y Nicklas W.J. (1994). Nitric oxide in retina: relation to excitatory amino acids and excitotoxicity. *Exp. Eye Res.* 58:343-350
- Zhang D.Q. y Eldred W.D. (1992). Colocalization of enkephalin-, glucagon-, and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in GABAergic amacrine cells in turtle retina. *Brain Res.* 596:46-57
- Zhang Y.D. y Straznicky C. (1991). The morphology and distribution of photoreceptors in the retina of *Bufo marinus*. *Anat. Embryol.* 183:97-104.
- Zhang D.Q. y Yang X.L. (1997). OFF pathway is preferentially suppressed by the activation of GABA(A) receptors in carp retina. *Brain Res.* 759:160-162
- Zhang J., Jung C.S. y Slaughter M.M. (1997). Serial inhibitory synapses in retina. *Vis. Neurosci.* 14:553-563
- Zhang J., Kleinschmidr J., Sun P. y Witkovsky P. (1994). Identification of cone classes in *Xenopus* retina by immunocytochemistry and staining with lectins and vital dyes. *Vis. Neurosci.* 11:1185-1192.
- Zhao Z.Y. y Toutiou Y. (1993). Response of rat pineal melatonin to calcium magnesium, and lithium is circadian stage dependent. *J. Pineal Res.* 14:73-77.

- Zhao Z.Y. y Touitou Y. (1994). Pineal perfusion with calcium channel blockers inhibits differently daytime and nighttime melatonin production in rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 101:189-196.
- Zhou Z.J., Fain G.L. y Dowling J.E. (1993). The excitatory and inhibitory amino acid receptors on horizontal cells isolated from the white perch retina. *J. Neurophysiol.* 70:8-19
- Zhu B.S. y Gibbins I. (1995). Synaptic circuitry of neuropeptide-containing amacrine cells in the retina of the cane toad, *Bufo marinus*. *Vis. Neurosci.* 12:919-927
- Zhu B.S. y Straznicky C. (1993). Co-localization of serotonin and GABA in neurons of the *Xenopus laevis* retina. *Anat. Embryol.* 187:549-555.
- Zhu B.S., Hiscock J. y Straznicky C. (1990). The changing distribution of neurons in the inner nuclear layer from metamorphosis to adult: a morphometric analysis of the anuran retina. *Anat. Embryol.* 181:585-594.
- Zhu B.S., Gabriel R. y Straznicky C. (1992). Serotonin synthesis and accumulation by neurons in the anuran retina. *Vis. Neurosci.* 9:377-388.
- Zhu Y. y Giddy JM. (1996) Hypoglycemic hyperemia in retina of newborn pigs. Involvement of adenosine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:86-92.
- Zucker C.L. y Dowling J.E. (1987). Centrifugal fibers synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina. *Nature* 330:166-168.
- Zucker C.L. y Ehinger B. (1993). Synaptic connections involving immunoreactive glycine receptors in the turtle retina. *Vis. Neurosci.* 10:907-914