

# LAS CÉLULAS CON MELANOPSINA: NUEVOS FOTORRECEPTORES EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS\*

Jorge Alberto Pérez-León<sup>1,2,3</sup> y R. Lane Brown<sup>1,4</sup>

## RESUMEN

Las células ganglionares de la retina codifican y proyectan hacia el encéfalo el impulso nervioso que inicia la percepción visual. Un subgrupo de estas neuronas sintetiza a la melanopsina, fotopigmento que les permite transformar a la luz en un impulso nervioso de manera homóloga a la fototraducción de los bastones y los conos. Se conoce a las células con melanopsina como células ganglionares fotorreceptoras o intrínsecamente fotosensibles (ipRGC) y se ha descrito su participación en una serie de funciones adicionales a la formación de imágenes (funciones accesorias o extravisuales de la retina), entre las que destaca la sincronización del ritmo circadiano por la luz. El mecanismo intracelular iniciado por la melanopsina es todavía una interrogante, así como las interacciones celulares que podrían modular la actividad de las ipRGC. El descubrimiento de las ipRGC y de su participación en las funciones extravisuales de la retina, ha generado una nueva línea de investigación en la fisiología retiniana y la fisiología sensorial en general.

**PALABRAS CLAVE:** Retina, melanopsina, células ganglionares, fototraducción, núcleos supraquiasmáticos.

## ABSTRACT

A special group of retinal ganglion cells contains the photopigment melanopsin which makes these cells intrinsically photosensitive. These cells are the photoreceptors described most recently in the retina (ipRGC). Behavioral, physiological and knocking out experiments have shown that ipRGC participate in a series of functions not related with vision, collectively known as extravisual functions of retina, the most prominent of these being photosynchronization of the circadian clock. It still remains to be described the phototransduction mechanism started by melanopsin and the cell-cell interactions that could modulate the ipRGCs functions. Hence, the discovery of these cells has opened a new research field within sensory physiology.

**KEY WORDS:** Retina, melanopsin, ganglion cells, suprachiasmatic nuclei.

## INTRODUCCION

La percepción visual comienza en la retina. Los fotorreceptores típicos de este tejido, conos y bastones, detec-

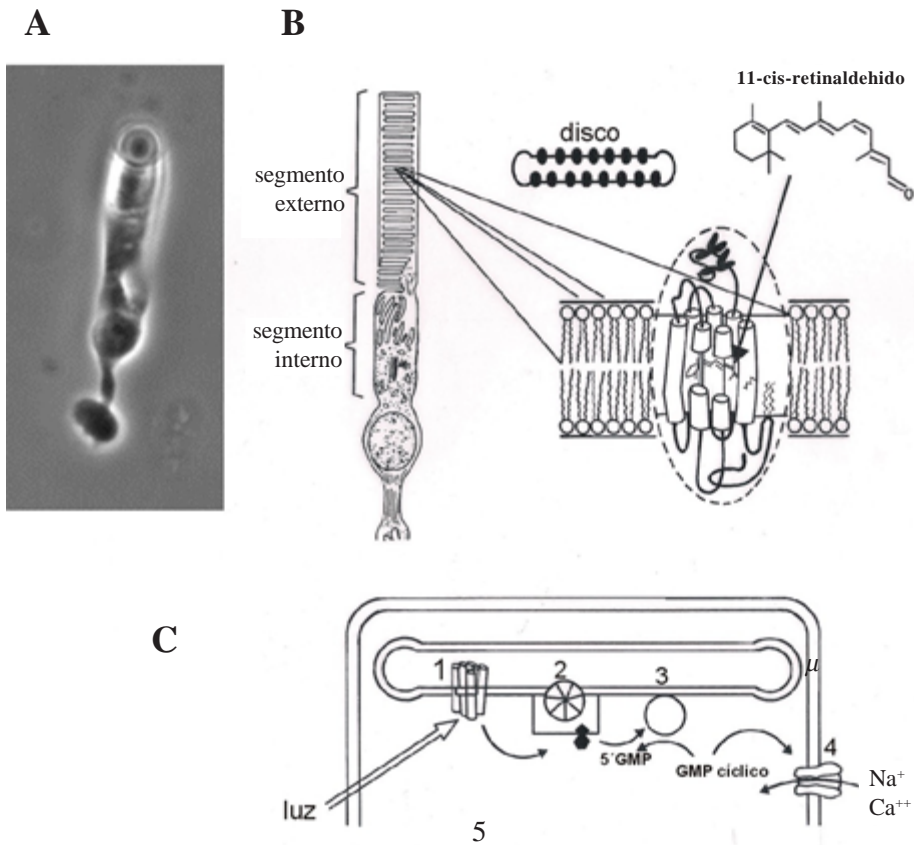
tan y transforman al estímulo luminoso en una señal eléctrica equivalente mediante la cascada de eventos conocida como fototransducción, un pro-

ceso que se inicia cuando la luz activa al fotopigmento de los conos (conopsina) y de los bastones (rodopsina). Las opsinas son proteínas

**Abreviaturas:** ipRGC: células ganglionares fotorreceptoras; 11-cis: 11-cis-retinaldehído; cGMP: monofosfato cíclico de guanosina; CNG: canal catiónico activado por cGMP; GDP/GTP: difosfato/trifosfato de guanosina; iLR: corriente activada por la luz en las ipRGC; TRP: canal iónico de potencial transitorio; RHT: tracto retinohipotalámico; PACAP: péptido activador de la adenilato ciclasa; SCN: núcleos supraquiasmáticos.

\*Recibido: 17 de junio de 2008 Aceptado: 10 de febrero de 2009

<sup>1</sup>Neurological Sciences Institute, Oregon Health & Science University, Portland, Oregon, USA. & <sup>2</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Dirección actual: <sup>3</sup>Programa de Química, Depto. Ciencias Básicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. <sup>4</sup>Department of Veterinary & Comparative Anatomy, Pharmacology & Physiology, Washington State University at Pullman, Washington, USA. Información de contacto: Tel + (656) 688 18 00 ext 1694, FAX (656) 688 18 00 ext 1894. Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo PRONAF y Estocolmo s/n, cp 32310. Ciudad Juárez, Chihuahua, MEXICO. Correo E: japl\_portland@hotmail.com, alberto.perez@uacj.mx.



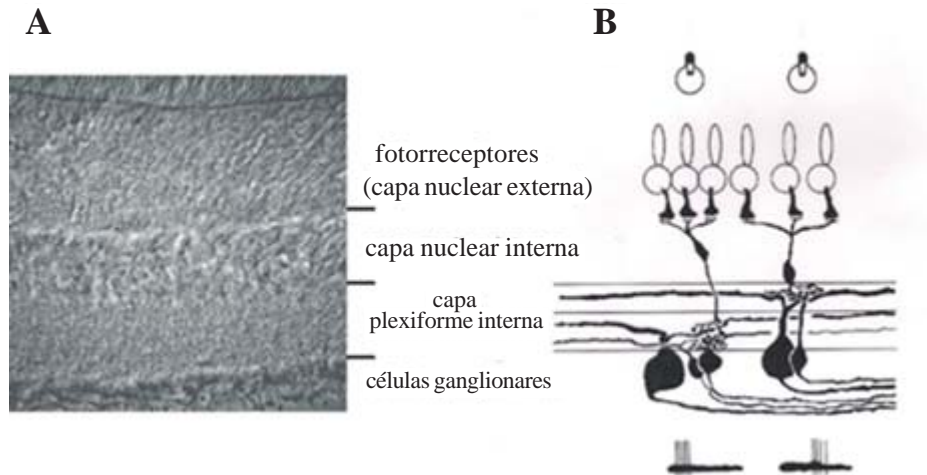
**Figura 1.** Morfología de los fotorreceptores y modelo del fotorpigmento rodopsina y del mecanismo de fototransducción en los vertebrados. (A) Bastón aislado (B) El segmento externo se forma por discos en donde se insertan la rodopsina y su cromóforo el 11-cis retinaldehído. (C) La fotoisomerización de la rodopsina (1) y la activación secuencial de la transducina (2) y la fosfodiesterasa (3) de GMP cíclico, provocan el cierre del canal catiónico CNG (4).

de siete segmentos transmembranales que se unen a la proteína G transducina. Entre los segmentos transmembranales 6 y 7 de las opsinas se inserta el cromóforo 11-cis retinaldehído (11-cis). La luz provoca la isomerización del 11-cis a su forma trans y el cambio conformacional que se produce en la opsina activa a la transducina; ésta induce la activación de la fosfodiesterasa del monofostato cíclico de guanosina (cGMP), que disminuye la concentración citoplásmica del nucleótido. La rodopsina y la conopsina presentan el mismo patrón estructural y mecanismo de activación que los receptores acoplados a proteínas G y son miembros peculiares de esta familia cuyo ligando no es una molécula, sino un fotón (Fig. 1).

En los fotorreceptores de los

vertebrados, en la oscuridad el GMPc mantiene abierto un canal catiónico (canal activado por nucleótidos cíclicos, CNG) que media una corriente despolarizante ("corriente oscura") que permite la secreción tónica de glutamato por parte del fotorreceptor. Como resultado del descenso citoplásmico de GMPc, el CNG se cierra, y el fotorreceptor se hiperpolariza, interrumpiendo la liberación de glutamato, lo que inicia la transmisión sináptica intrarretiniana en todos los vertebrados (Fig. 1).

El impulso nervioso generado en los fotorreceptores de los vertebrados se transmite por las interneuronas retinianas a las neuronas de proyección, las células ganglionares (RGC), cuyos axones forman el nervio óptico. En la mayoría de las RGC, la respuesta provocada por la luz resulta de la activación de la red sináptica retiniana, por lo que se denomina respuesta sináptica a la luz y consiste en la modificación de la frecuencia de potenciales de acción, definida como respuesta de encendido (ON) o apagado (OFF), que se han estudiado fun-



**Figura 2.** Histología y organización funcional de la retina. (A) Corte vertical de la retina de ratón. Capa nuclear interna: interneuronas; capa plexiforme interna: sinapsis entre las interneuronas y las células ganglionares. (B) Los fotorreceptores transmiten el impulso nervioso a las células bipolares y la transmisión sináptica sigue un curso vertical hacia las células ganglionares. Las respuestas de las neuronas (trazos esquemáticos) consisten en aumentar (ON) o disminuir (OFF) la frecuencia de potenciales de acción. Se omitió al resto de las interneuronas por simplificación.

damentalmente en el proceso de formación de imágenes (Fig. 2).

Existen además varios procesos fisiológicos mediados por la aferencia retiniana al encéfalo que no desembocan en la formación de imágenes. Estas funciones son conocidas como "extravisuales" o "funciones accesorias de la retina", entre ellas se encuentran el reflejo pupilar y la sincronización del ritmo circadiano por la luz. El aspecto más sobresaliente de tales funciones es que se inician por la actividad de RGC específicas que, junto con la respuesta sináptica, generan una respuesta intrínseca a la luz, por lo que se conocen como células ganglionares fotorreceptoras o intrínsecamente fotosensibles (ipRGC). Las ipRGC actúan como fotorreceptores debido a la actividad de la melanopsina, un fotopigmento homólogo a la rodopsina y la conopsina. Cuál es el papel de las ipRGC en las diversas funciones accesorias de la retina, cómo es que se modula su actividad por las aferencias y, sobre todo, la dilucidación de la cascada de fototransducción iniciada por la melanopsina en estos nuevos fotorreceptores, son actualmente algunas de las interrogantes de mayor interés en la fisiología retiniana.

### **Las Células Ganglionares Fotorreceptoras**

La evidencia más contundente sobre la existencia de un fotorreceptor adicional a los conos y bastones se obtuvo en el campo de investigación de los ritmos biológicos. En los mamíferos, los ritmos biológicos más conspicuos y mejor caracterizados tienen períodos de 24 horas, por lo que se denominan circadianos. Los ritmos circadianos se mantienen incluso cuando el organismo está privado de las señales ambientales que marcan los cambios de horario, lo que indica que la ritmicidad se mantiene por la actividad de un reloj endógeno u oscilador

biológico. El oscilador de la ritmicidad circadiana de los mamíferos está localizado en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo, que se localizan simétricamente en la periferia del tercer ventrículo del encéfalo, en posición dorsal al quiasma óptico (1).

La mayoría de los animales han adaptado su actividad metabólica y conductual al ciclo geotérmico luz-oscuridad y el oscilador biológico se sincroniza a este ciclo. La sincronización precisa depende de la percepción de los cambios de horario señalados por las variaciones en la luminosidad ambiental, por lo que se denomina sincronización fótica o fotosincronización del ritmo circadiano. Este es un proceso que requiere indispensablemente de la integridad de los globos oculares y de la eferencia retiniana al encéfalo.

En 1999, Lucas y sus colaboradores (2) demostraron que los ratones carentes de conos y bastones presentaban fotosincronización de la secreción de melatonina. Como el fenómeno dependía estrictamente de la integridad de los globos oculares, al carecer estos animales de los fotorreceptores típicos, la fotosincronización podía explicarse solamente por la actividad de un tipo adicional de fotorreceptor, lo que llevó a proponer la existencia y búsqueda de un fotorreceptor diferente a conos y bastones en la retina de los mamíferos (2).

Se tratara de un fotorreceptor típico o nuevo, la fotosincronización requería además de la existencia de una eferencia retiniana directa hacia los núcleos supraquiasmáticos. Diversos grupos describieron la existencia de una proyección retinofugal monosináptica a los núcleos supraquiasmáticos en los roedores (revisado en 3) y varios de esos estudios demostraron que este tracto retino-hipotalámico (RHT) se constituye por axones que contienen al péptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP). De esta

manera, se estableció la presencia del PACAP como la característica distintiva de las células retinianas del RHT.

En una línea de investigación paralela, Provencio y colaboradores aislaron y clonaron al gen del fotopigmento de los melanocitos epidérmicos de la rana *Xenopus*, la melanopsina. Además de haber sido localizado en los melanocitos, el ARN mensajero de la melanopsina se encontró de manera especialmente densa en la capa de células ganglionares de la retina. Mediante varios estudios posteriores, éstos y otros investigadores (3 y referencias incluidas) demostraron que las células retinianas con melanopsina sintetizan también al PACAP, la característica distintiva de las células ganglionares del RHT.

Para confirmar que las células que forman al RHT son las mismas que sintetizan a la melanopsina, Gooley y colaboradores utilizaron el transporte retrógrado de trazadores fluorescentes inyectados en el SCN y la localización del ARN mensajero de la melanopsina dentro de la retina, corroborando la identidad de las células (revisado en 3). Estos datos fueron la base para proponer a las células con melanopsina como los fotorreceptores adicionales a los conos y bastones, cuya actividad mediara la fotosincronización del SCN. Sin embargo, faltaba demostrar que las células con melanopsina eran capaces de responder a la luz.

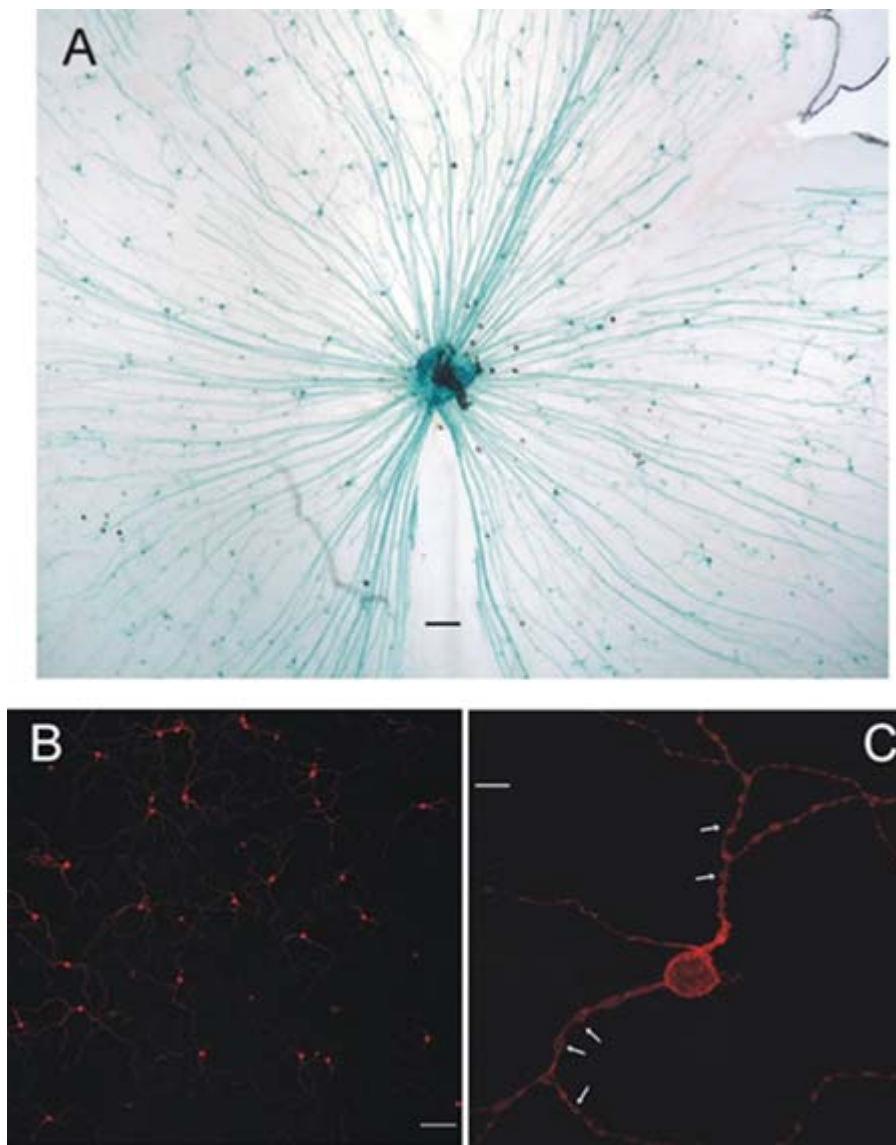
El grupo de investigación de D. Berson (3) fue el primero en registrar electrofisiológicamente la respuesta intrínseca a la luz en las células con melanopsina. Estos autores encontraron que la luz activa una corriente despolarizante en estas células, aun bajo la inhibición total de la transmisión sináptica intrarretiniana e incluso en las células aisladas del tejido, indicando su propiedad intrínseca de responder a la luz. La melanopsina fue detectada en todas las células registradas, demostrando que actúa como

un fotopigmento y que las células que la sintetizan son fotorreceptores, siendo ésta la descripción original de las células ganglionares fotorreceptoras o células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC, 3).

El mismo grupo utilizó una cepa de ratones con el gen de melanopsina acoplado a la beta-galactosidasa, para describir la morfología y la proyección central de las ipRGC (3). En la retina únicamente el 2% del total de las células ganglionares contienen melanopsina. Los somas de éstas se encuentran en la capa de células ganglionares, aunque poco más del 5% están desplazados hacia la capa sináptica de las interneuronas retinianas. En las retinas de la rata y el ratón las dendritas de las ipRGC presentan varicosidades, que pueden ser los compartimientos intracelulares en los que se agrupa la melanopsina (Fig. 3).

En la rata la dimensión promedio de los somas de las ipRGC es de 15  $\mu\text{m}$ . Aunque la densidad es mayor en las regiones superior y temporal de la retina y la morfología varía con su localización dentro de la superficie retiniana, no se había propuesto la existencia de subtipos de ipRGC. El árbol dendrítico de las ipRGC está poco ramificado y se extiende en un área promedio de 500  $\mu\text{m}^2$ . A diferencia de las células ganglionares típicas, que extienden su árbol dendrítico en uno solo de los estratos de la capa plexiforme interna, las ipRGC ramifican sus dendritas a todo lo ancho de esta capa, una peculiaridad que las distingue del resto de las ganglionares. En cuanto a su proyección al encéfalo, los axones de las ipRGC llegan a los SCN y forman además una decusación hacia los núcleos geniculados ventrolateral y del pretectum (3).

Las células con melanopsina del humano y del macaco fueron descritas por Dacey y colaboradores (4). En ambas especies las ipRGC tienen



**Figura 3.** Distribución y morfología de las células con melanopsina. (A) Los somas se distribuyen sobre toda la superficie de la retina y sus axones convergen en el nervio óptico. (B) Los somas y dendritas tienen un patrón regular de distribución. (C) La melanopsina está sobre la membrana plasmática, incluso en las varicosidades (flechas). A, histoquímica de la actividad de beta-galactosidasa en un ratón transgénico con la proteína de fusión Melanopsina::Tau::LacZ. B y C inmunofluorescencia de la melanopsina en la retina del ratón. Barras: A=200  $\mu\text{m}$ , B= 100  $\mu\text{m}$ , C= 20  $\mu\text{m}$ .

soma y árbol dendrítico atípicamente grandes (más de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 500 a 1200  $\mu\text{m}^2$  respectivamente). Como en los roedores, las ipRGC del macaco y del humano ramifican sus dendritas a lo ancho de la capa plexiforme interna. En estos primates hay una proporción mayor de las ipRGC desplazadas hacia la capa plexiforme interna, representando has-

ta el 40% de las células con melanopsina. Es relevante que en el macaco los axones de las ipRGC se ramifican y prolongan hasta el núcleo geniculado lateral, el primer relevo de la vía visual y en consecuencia a esta proyección anatómica, en el macaco las ipRGC participan en la integración inicial del estímulo visual (ver más adelante). Un trabajo posterior demostró

que en la retina humana cerca del 3% de los conos sintetizan melanopsina (5), pero no ha habido estudios sobre la posible participación de la melanopsina en la fototransducción que realizan los conos.

Se ha estudiado la morfología y distribución de las células con melanopsina únicamente en un primate más, el mono tití (*Callitrix jacchus*, 6). La retina de este mono del Nuevo Mundo presenta dos tipos de células con melanopsina, el primero cuyas dendritas se ramifica cerca de la capa nuclear interna y un segundo grupo en el que el árbol dendrítico cubre los estratos adyacentes a la capa de células ganglionares. De acuerdo a la extensión y densidad del árbol dendrítico, cada uno de estos grupos constituye un subtipo morfológico (6). La existencia de estos dos tipos morfológicos en la retina del mono tití sugiere que hay diversos subtipos de células con melanopsina en la retina de los primates, lo que ya se ha descrito para la retina de los roedores.

Varios grupos han confirmado las características morfológicas descritas en el ratón y la rata (7). En el ratón existen tres tipos de ipRGC, los cuales se distinguen por la extensión de su ramificación dentro de la capa plexiforme interna: los tipos 1 y 2 tienen una estratificación simple del árbol dendrítico, proximalmente a la capa nuclear interna en el tipo 1, o cerca de la capa de células ganglionares en el tipo 2, mientras que las ipRGC tipo 3 están biestratificadas, extendiendo sus dendritas en ambas zonas.

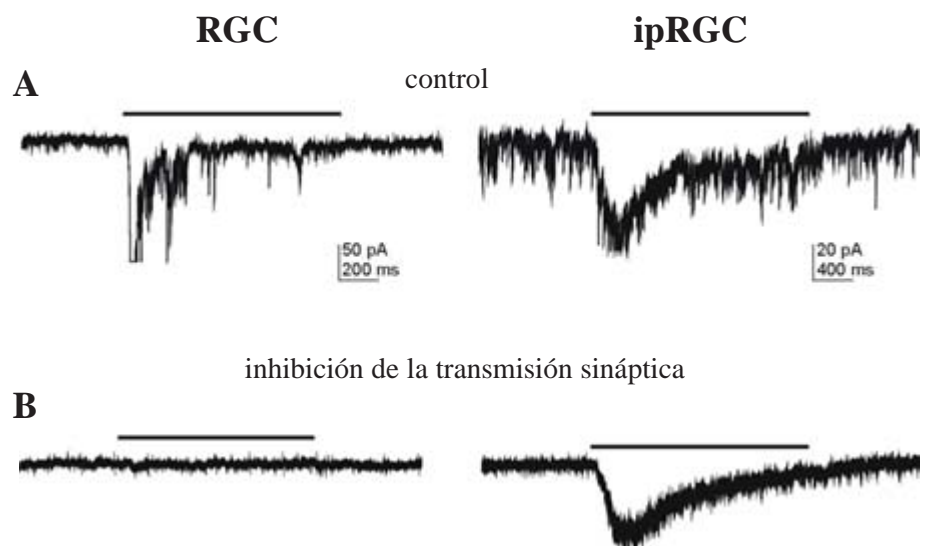
Además de estos estudios, las células con melanopsina han sido descritas también en el topo *Spalax* (referencias en 8), pero se carece de una descripción de estas células en la retina de otros mamíferos. En cuanto a las diferentes clases de vertebrados, se han estudiado las ipRGC en el pollo (9) y se han publicado las secuen-

cias de los genes de la melanopsina en peces, aves y reptiles (10). Al respecto, se han aislado dos genes de la melanopsina en las diferentes clases de vertebrados. Los mamíferos tienen el gen *OPN4m*, presente también en las otras clases de vertebrados, mientras que en los peces, los anfibios y las aves hay un gen adicional, denominado *OPN4x*, el mismo que se caracterizó inicialmente en los dermatocitos de *Xenopus*. La similitud entre los dos genes dentro de cada especie es menor al 30%, pero la similitud de cada gen entre las diferentes especies es cercana al 70%, lo que indica que la duplicación del gen ancestral ocurrió incluso antes de la aparición de los tetrápodos. Debe haber existido una gran presión selectiva para mantener a ambos genes a lo largo de la escala filogenética y resulta muy interesante que sean precisamente los mamíferos, los únicos vertebrados carentes de fototransducción extraocular, los que presentan un gen único de melanopsina.

### La respuesta intrínseca a la luz

La caracterización *in situ* de la respuesta intrínseca a la luz (iLR) se ha realizado en las ipRGC de la rata y el ratón (3, 7). Las ipRGC responden a la luz con una despolarización de latencia prolongada, hasta de un segundo posterior al inicio del estímulo, tanto en la retina intacta como bajo la inhibición total de la transmisión sináptica. La iLR se mantiene mientras dura el estímulo luminoso, provocando una despolarización máxima de 30 mV y el disparo de potenciales de acción dependientes de canales de  $\text{Na}^+$ . Los potenciales de acción pueden eliminarse por la aplicación de tetrodotoxina sin afectar a la iLR (Fig. 4).

La despolarización provocada durante la iLR se debe a la activación de una corriente entrante en el intervalo de voltajes de membrana de -30 a -100 mV, de conductancia aproximada de 2 nanoSiemens (7). La corriente se reduce en voltajes de membrana fuera de este intervalo, muy

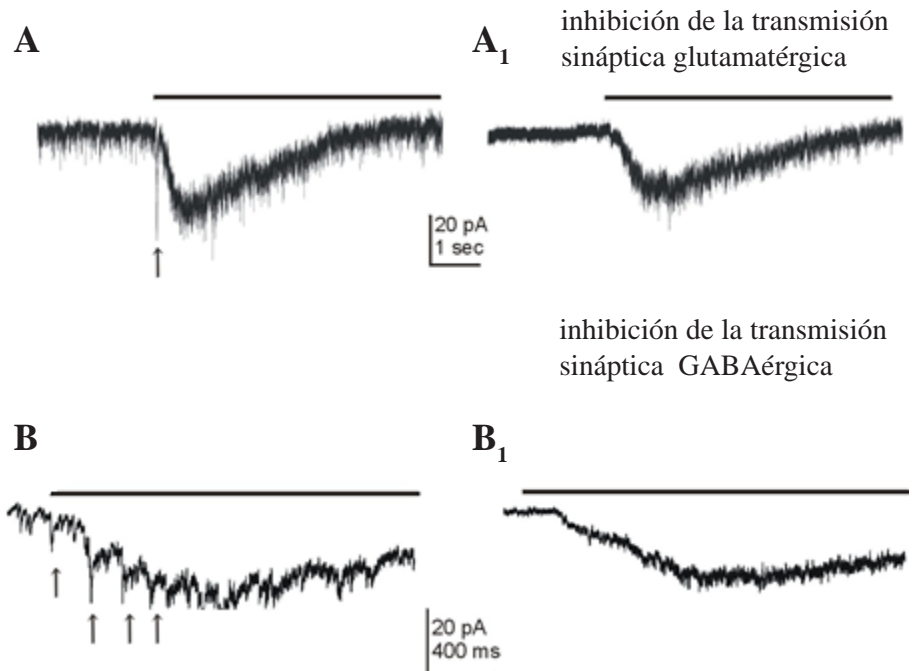


**Figura 4.** Respuestas de las células ganglionares a la estimulación luminosa (barra sobre los trazos): (A) Las células ganglionares típicas (RGC) y las ipRGC responden a la estimulación luminosa con una corriente despolarizante (deflexión en el trazo), obsérvese que en las ipRGC la respuesta se mantiene mientras dura el estímulo. (B) Después de inhibir la transmisión sináptica, es nula la respuesta de las RGC, en las ipRGC permanece la respuesta intrínseca a la luz, mediada por la melanopsina. Registro de retina de rata mediante fijación de voltaje de célula completa (whole cell voltage clamp).

hiperpolarizados o despolarizados (recificación saliente y entrante). En cuanto a dependencia iónica, la corriente no disminuye por la carencia de  $\text{Na}^+$  extracelular, es acarreada principalmente por el  $\text{Ca}^{++}$  y se abate por los lantánidos. La disminución en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  provoca la reducción del pico de la corriente activada por la luz, así como aumenta el tiempo necesario para alcanzar este valor.

Hay una serie de evidencias de que la iLR requiere de la participación de proteínas G, por ejemplo, la magnitud de la corriente puede alterarse por análogos no hidrolizables del GTP, mediante la inhibición de las fosfodiesterasas citoplásmicas o alterando la concentración citoplásmica de AMP ó GMP cíclicos. La latencia de la corriente y su disminución conforme aumenta el tiempo de registro, señalan también la existencia de un mecanismo mediado por proteínas G y mensajeros intracelulares (7).

Los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG) son el efector final en la fototransducción de conos y bastones, por lo que se ha investigado su participación en la iLR, sin embargo, en las ipRGC la aplicación de nucleótidos cíclicos no activa la corriente ni ésta se altera por los inhibidores de los CNG. Además, las proteínas que constituyen a estos canales no se localizan en las ipRGC (7). En cambio, la corriente activada por la luz es sensible a los lantánidos y al rojo de rutenio, moléculas que actúan sobre los canales de potencial transitorio (TRP) y adicionalmente, las subunidades del subtipo TRP<sub>6</sub> colocalizan con la melanopsina en las ipRGC de la rata (7). Todas estas características son semejantes entre la iLR y la fototraducción en los fotorreceptores de invertebrados, en particular de drosófila, en la cual participan los fosfoinosítidos en conjunto con los TRP.



**Figura 5.** Respuestas sinápticas de las ipRGC. (A, B) La respuesta a la luz tiene 2 componentes: el sináptico (flechas) y la respuesta intrínseca a la luz. El componente sináptico se elimina con inhibidores específicos de receptores postsinápticos ( $A_1$ ,  $B_1$ ), indicando que las ipRGC reciben aferencias mediadas por varios neurotransmisores. Registro de retina de rata mediante fijación de voltaje en modalidad de célula completa (whole cell voltage clamp).

En las retinas de la rata, el macaco y el ratón, la corriente de las ipRGC se activa por estímulos de longitudes de onda entre 400 a 600 nm, con el máximo alrededor de los 480 nm (3, 4). Este espectro y pico de absorción corresponden a un cromóforo derivado de la vitamina A. La carencia de vitamina A inhibe completamente a la respuesta activada por la luz en el ratón y en la rata, efecto que puede revertirse por la infusión de análogos del 11-cis y que constituye una evidencia contundente de que en las ipRGC la melanopsina utiliza como cromóforo a esta molécula (revisado en 11). Se ha demostrado también la actividad intrínseca de la melanopsina para reiseromerizar al 11-cis del 11-trans, un paso indispensable para regenerar la capacidad fotoactivable. Esta propiedad se presenta también en los fopigmentos de los moluscos, pero no se había descrito en los vertebrados (11 y referencias incluídas).

Las ipRGC del mono macaco generan potenciales de acción al activarse la aferencia proveniente del sistema de bastones y de conos, en especial de los conos de longitud de onda corta (4). En las ipRGC de la rata se han registrado corrientes sinápticas de los receptores ionotrópicos de los ácidos glutámico y gama-aminobutírico, lo que indica la actividad aferente de las células bipolares y amacrinias (12, 13). Tales datos indican la participación de las ipRGC en la red sináptica intrarretiniana, por lo que resulta muy interesante dilucidar si los fotorreceptores clásicos modulan a las ipRGC, si éstas participan en el proceso de la percepción visual o si ocurren ambos casos (Fig. 5).

### El mecanismo de fototraducción de las ipRGC

Aún son interrogantes las proteínas G y el tipo (o tipos) de canal iónico que participan en la fototraducción de la

melanopsina. Antes de revisar la evidencia disponible, es importante considerar que la mayoría de los estudios se han realizado en sistemas de expresión heteróloga, así que los resultados podrían deberse más a la capacidad de la melanopsina para activar al sistema de transducción con el que se acople experimentalmente, que reflejar el mecanismo propio de las ipRGC.

La primera evidencia *in vitro* de la actividad de la melanopsina como un fotopigmento fue obtenida con células cultivadas en las que se indujo la expresión heteróloga de este fotopigmento. Newman y colaboradores (revisado en 7) demostraron que la melanopsina puede activar a la transducina para intercambiar GDP por GTP y que este proceso depende de la estimulación luminosa. Si bien fue la primera evidencia de la activación directa de una proteína G por melanopsina, es importante señalar que las ipRGC no sintetizan transducina, así que ésta no podría actuar como transductor en la iLR.

En los melanóforos de *Xenopus* la melanopsina se acopla al sistema de la fosfolipasa  $C_b$ , que activa a la PKC por hidrólisis de fosfoinosítidos y aumento en la concentración de  $Ca^{++}$  (revisado en 11). Sin embargo, no se ha descartado la existencia de otras opsinas en los melanóforos y por otro lado, las melanopsinas de la rana y la de los mamíferos están codificadas por genes diferentes, por lo es probable que se acoplen proteínas G distintas.

Se ha tratado también de homologar la fototraducción por melanopsina con la de los fotorreceptores de drosófila. La rodopsina de la mosca se encuentra acoplada a una proteína  $G_q$  que también activa la cascada de la fosfolipasa  $C_b$ , la hidrólisis de fosfatidilinositol y la activación de la PKC. En estos fotorreceptores el efector final es un canal del tipo TRP,

permeable a  $Ca^{++}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$ , de corriente despolarizante, con características similares a la corriente activada por la luz en las ipRGC.

En el año 2005 se publicaron simultáneamente varios estudios de coexpresión heteróloga del gen de la melanopsina con el canal TRP $_c3$ , realizados en células renales de embrión humano, en neuroblastos de ratón y en ovocitos de *Xenopus* (11 y referencias incluidas). La coexpresión heteróloga de estas proteínas provocó que las células respondieran a la estimulación luminosa con una corriente despolarizante mediada por el TRP $_c3$  y la liberación de  $Ca^{++}$  de las posas intracelulares. En cada uno de los estudios se identificó a una proteína  $G_q$  como la proteína activada por la melanopsina, por lo que se propuso que dicho subtipo de proteína G podría desencadenar una cascada de mensajeros secundarios convergentes en la apertura del TRP $_c3$  en las ipRGC.

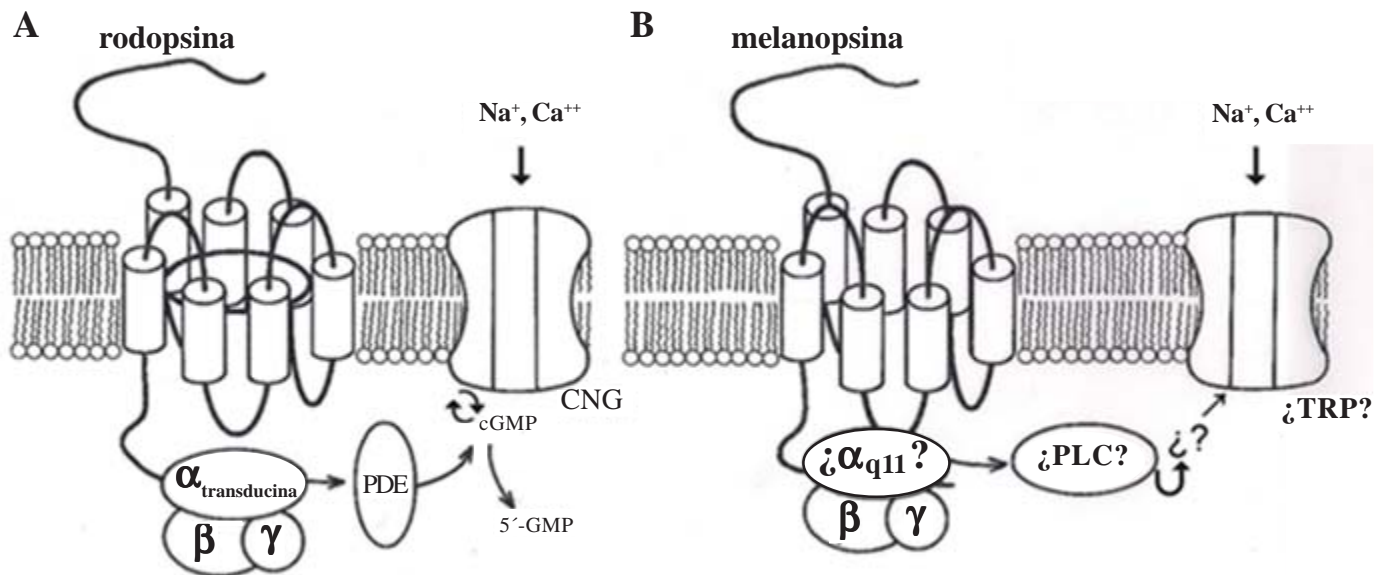
Un estudio realizado en ipRGC cultivadas de la retina del pollo, ha confirmado la participación de una proteína  $G_q$ , la hidrólisis de fosfoinosítidos y la movilización de  $Ca^{++}$  de las posas intracelulares (9). En otra preparación de ipRGC cultivadas de la retina de la rata se ha demostrado la participación de un canal TRP $_c$ , aunque en esta especie la movilización del  $Ca^{++}$  de las posas intracelulares es negligible en la generación de la iLR; en cambio es contundente la evidencia de que la despolarización inducida por la luz abre los canales de  $Ca^{++}$  activados por voltaje en la membrana plasmática y que estos median la mayor parte de la corriente (revisado en 14). Estos datos contradictorios pueden señalar diferencias interespecíficas que concuerdan con la presencia de diversos genes de la melanopsina. La perspectiva de varios mecanismos de fototraducción acoplados a las diferentes melanopsinas es fascinante.

Existen pocos estudios sobre el mecanismo de fototraducción realizados en las ipRGC *in situ*. Warren y colaboradores (7) han publicado datos que descartan a los CNG, pero que confirman la participación de una proteína  $G_q$  y que demuestran también la existencia de un canal TRP, probablemente el TRP $_c6$ , en estas células. En una preparación experimental similar, Graham y colaboradores (14) demostraron la activación por la luz de una proteína  $G_q$  y de la PLC $\beta$  en fracciones de membrana separadas de las ipRGC, indicando que los elementos de la cascada de fototraducción están adosados a la membrana plasmática. Además, este grupo ha demostrado el requerimiento estricto del sistema de fosfoinosítidos en la generación de la respuesta intrínseca a la luz en las ipRGC de la rata, sin embargo, no se proporcionó evidencia sobre el canal iónico que actúa como efector final.

La cascada intracelular activada por la melanopsina en las ipRGC aun no está descrita completamente y pese a los avances logrados por los experimentos de coexpresión heteróloga y mediante los cultivos de estas células, la descripción cabal podría lograrse únicamente por el estudio de las células en la retina completa. Se presenta un modelo esquemático acerca del mecanismo propuesto para explicar la cascada de fototraducción de las ipRGC en la figura 6.

### **Ontogenia de las células con melanopsina**

La diferenciación de las neuronas retinianas ocurre durante el período postnatal. Las células ganglionares son las primeras en diferenciarse y tienen actividad sináptica espontánea antes de que se diferencien el resto de las neuronas. La segregación de las eferencias de las células ganglionares se efectúa durante los primeros días de la etapa postnatal y se determina por competencia sináptica. Durante la



**Figura 6.** Las opsinas son receptores acoplados a proteínas G. (A) La rodopsina activa a la  $\alpha_{\text{transducina}}$ , el efector secundario es la fosfodiesterasa del GMP cíclico y el efector final es el canal catiónico activado por nucleótidos cíclicos (CNG). (B) Se propone que la melanopsina activa a una proteína del tipo  $G_q$  y que el supuesto efector secundario es una isoforma de la fosfolipasa C (PLC), siendo el efector final un canal del tipo TRP (canales de potencial transitorio). En el texto se discuten las evidencias al respecto.

ontogenia hay una producción super-numeraria de estas células y su proyección al encéfalo está formada antes de que los fotorreceptores sean funcionales; éstos y las células horizontales se diferencian posteriormente y establecen sinapsis recíprocas, mientras que las células bipolares son las últimas neuronas retinianas en diferenciarse.

Los fotorreceptores se diferencian en el ratón en el décimo día de vida (P10) y en la rata en P12. Las células con melanopsina pueden detectarse desde el nacimiento (P0), en número hasta cinco veces mayor al que se encuentra en la etapa adulta. En ambas especies, las ipRGC responden a la estimulación luminosa desde P0, mediante la expresión del gen c-fos en la rata (8) y por la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  de las posas intracelulares en el ratón (15).

En la rata neonata puede detectarse al PACAP en las fibras que inervan a los SCN y las neuronas de estos núcleos expresan c-fos en respuesta a la estimulación luminosa, lo que indica que el tracto retinohipotalámico ya está formado a esta temprana edad (8). La

cantidad de células con melanopsina y la proporción de éstas que responden a la estimulación luminosa se reducen drásticamente en la retina durante P2 a P5, pues las ipRGC atraviesan el mismo proceso de selección neuronal al que está sometido el resto de las células ganglionares. La actividad de las aferencias determina la topología de las zonas encefálicas a las que proyectan y el hecho incontrovertible de que las ipRGC estén activas antes que los fotorreceptores típicos, plantea la interrogante de si esas células pueden influir en la topología de las estructuras encefálicas involucradas en la visión.

### Funciones de las ipRGC

La capacidad intrínseca de fototransducción, la proyección monosináptica a los SCN, su actividad desde el nacimiento y el amplio intervalo de intensidad luminosa bajo el cual se activan, convierte a las ipRGC en los fotorreceptores mejor adaptados para informar al organismo respecto a las condiciones luminosas ambientales.

Las diversas cepas de ratones carentes de fotopigmentos han demostrado que la fotosincronización es una tarea conjunta de las ipRGC y los conos y bastones, lo que aun resta por dilucidar es si las ipRGC son las únicas células retinianas que proyectan directamente al SCN. El análisis de la actividad sináptica de las ipRGC permite concluir que éstas reciben aferencias de las células amacrinas y bipolares y en consecuencia, convergen en ellas la vía de los conos y bastones (12, 13) al igual que en el resto de las células ganglionares. Resulta interesante especular si la señal proveniente de los fotorreceptores clásicos se integra a la respuesta intrínseca a la luz, es decir, si los conos y bastones utilizan a la proyección tendida por las ipRGC para sincronizar directamente a los SCN, o si la vía de conos y bastones utiliza una proyección de células ganglionares típicas.

Es interesante también la posibilidad de que las ipRGC puedan participar en la formación del estímulo visual, al menos en los primates. En el macaco las ipRGC proyectan princi-



palmente a los SCN, pero hay una decusación importante hacia el cuerpo geniculado lateral; por otro lado, las ipRGC del macaco responden a la activación de los conos de longitud de onda corta y los de onda media y larga, es decir, sobre ellas convergen los impulsos generados en los conos azules, verdes y rojos, siendo las únicas células ganglionares que sensan todo el intervalo cromático del estímulo visual (4).

La actividad de las ipRGC se requiere también para el reflejo pupilar. Antes del descubrimiento de las ipRGC, se había determinado que este reflejo requiere la actividad de un fotorreceptor adicional a los conos y bastones, con un pigmento acoplado al 11-cis, es decir, una opsina (2). Algunos estudios posteriores en los mutantes carentes de melanopsina, han demostrado que el reflejo pupilar se deteriora por la carencia de melanopsina y la consecuente inactivación de las ipRGC (3).

### Regulación de la actividad de las ipRGC

La síntesis de melanopsina experimenta ciclos circadianos, ya sea en condiciones de luz-oscuridad u oscuridad constante, el ARNm de la melanopsina

se transcribe rítmicamente, con el máximo entre las 12 y las 14 horas del horario subjetivo. La ritmicidad depende de los conos y bastones y de la red sináptica intrarretiniana, y desaparece en animales en los que degeneran los fotorreceptores. Aunque la síntesis del ARNm de la melanopsina se abate en estas condiciones, no desaparecen las células que deberían sintetizarla, ya que pueden detectarse por la presencia del PACAP (revisado en 16).

La dopamina incrementa la síntesis del ARNm de la melanopsina actuando a través de receptores D2 en las ipRGC, lo que se ha demostrado con agonistas específicos de este receptor y mediante la co-localización del ARNm del D2 y de la melanopsina en la rata (16). Aunque son todavía escasos, estos datos indican una compleja interacción intrarretiniana en la producción y actividad de la melanopsina y de las funciones de las ipRGC.

### Conclusión

El descubrimiento de la melanopsina y de las ipRGC ha proporcionado fundamento a la idea intuitiva de que la retina media la percepción del transcurso del día a partir de la luminosidad

ambiental, lo que permite al organismo sincronizar su actividad metabólica. Entre los temas más interesantes surgidos por la descripción de las ipRGC está la dilucidación de su mecanismo de fototraducción; describir este proceso enriquecerá nuestra comprensión sobre la interacción proteína-luz y de los mecanismos filogénicos para utilizar esta interacción a favor de la comunicación celular. Sobre todo, el estudio de las ipRGC ha dado lugar a la búsqueda de nuevos fotopigmentos y fotorreceptores retinianos. Dilucidar su existencia y su participación en la percepción visual y en las funciones extravisuales, son objetivos que fortalecen la posición de la retina en la marquesina de la Neurociencia, lugar que ha ocupado desde los inicios de esta disciplina.

**Agradecimientos.** Agradecemos a S. Hattar (John Hopkins University) por proporcionar el transgénico Melanopsina::Tau::LacZ. Jorge Pérez-León agradece a Rocío Salceda por su hospitalidad y enriquecedora asesoría a lo largo de su carrera. Este trabajo está dedicado a Marisela Aguirre, en tributo a su fulgurante luz.

## REFERENCIAS

- Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290.
- Lucas RJ, Freedman MS, Muñoz M, Garcia-Fernandez JM, Foster RG (1999) Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284: 506-507.
- Hattar S, Liao H-V, Takao M, Berson DM, Yau, KW (2002) Melanopsin containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295: 1065-1070.
- Dacey DM, Liao HW, Peterson BB, Robinson FR, Smith VC, Pokorny J, Yau KW, Gamlin PD (2005) Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* 433: 749-754.
- Dkhissi-Benyahya O, Rieux C, Hut RA, & Cooper HM (2006) Immuno histochemical evidence of a melanopsin cone in human retina. *Inv Ophthal & Vis Sci* 47: 1636-1641.
- Jusuf PR, Lee SCS, Hannibal J & Grünert U (2007) Characterization and synaptic connectivity of melanopsin-containing ganglion cells in the primate retina. *Eur J Neurosci* 26 (10): 2906-2921.
- Warren EJ, Allen CN, Brown RL, Robinson DW. (2006) The light-activated signaling pathway in SCN-projecting rat retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci* 23(9): 2477-87.
- Hannibal J & Fahrenkrug J (2004) Melanopsin containing retinal ganglion cells are light responsive from birth. *Neuroreport* 15: 2317-2320.

9. Contin MA, Verra DM & Guido M (2006) An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells. *FASEB J* 20: E1-E9.
10. Bellingham J, Chaurasia SS, Melyan Z, Liu C, Morven P, Iuvone M, Hankins MW, Tosini G, Lucas RJ (2006) Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *Proc Royal Soc Lond Biol* 4: 1-10.
11. Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB & Jegla T (2005) Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 307: 600-604.
12. Perez-León JA, Warren E, Allen CN, Robinson DW & Brown RL. (2006) Synaptic inputs to retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Eur J Neurosci* 24: 1117-1123.
13. Wong KY, Dunn FA, Graham DM & Berson D (2007) Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *J Physiol* 582(Pt 1): 279-96.
14. Graham DM, Wong KY, Shapiro P, Frederick C, Pattabiraman K, Berson DM. (2008) Melanopsin ganglion cells use a membrane-associated rhabdomeric phototransduction cascade. *J Neurophysiol* 99(5): 2522-32.
15. Sekaran S, Lupi D, Jones SL, Sheely CJ, Hattar S, Yau KW, Lucas RJ, Foster RG, Hankins MW. (2005) Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Cur Biol* 15: 1099-1107.
16. Sakamoto K. , Liu C, Kasamatsu M, Pozdeyev NV, Iuvone M , Tosini G (2005) Dopamine regulates melanopsin mRNA expression intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci* 22: 3129-3136.