

## INTRODUCCIÓN.

Han pasado 46 años desde que se demostró por primera vez que la aplicación de glutamato monosódico en la corteza cerebral inducía depolarizaciones masivas (Hayashi, 1954). A esta observación puntual indicando un posible papel del glutamato como agente excitador del Sistema Nervioso Central (SNC), le siguieron estudios electrofisiológicos más detallados demostrando efectos depolarizantes tanto del glutamato como del aspartato en neuronas aisladas del SNC de vertebrados y que éstos eran el resultado de un aumento de la conductancia de la membrana a sodio.

En la década de los 70 se realizaron los trabajos demostrativos de que el glutamato cumplía la mayor parte de los criterios para ser considerado neurotransmisor en el SNC de los mamíferos. La presencia de receptores para glutamato en las membranas neuronales (Evans *et al.*, 1979), la liberación de glutamato por las terminales nerviosas tras la excitación (Hamberger *et al.*, 1979), así como la existencia de sistemas de transporte específicos de alta afinidad tanto en células gliales como en terminales nerviosas (Logan y Snyder, 1972), apoyaron fuertemente la hipótesis de que el glutamato era el neurotransmisor excitador por excelencia en el SNC. Además, el conocimiento de la existencia de rutas metabólicas biosintéticas y degradativas de glutamato en neuronas así como la presencia de un transportador dependiente de ATP implicado en el almacenaje de glutamato en vesículas sinápticas, igualmente sirvieron para consolidar esta conclusión.

En la actualidad, está bien establecido que el glutamato es el agente neurotransmisor usado en la mayoría de las sinapsis excitadoras del Sistema Nervioso Central de los mamíferos. Además de la función del glutamato como mediador de la transmisión sináptica, este aminoácido participa durante la formación del sistema nervioso en procesos de crecimiento y maduración neuronal, en la formación y eliminación de sinapsis y, en determinadas áreas y de forma dependiente de actividad, en la formación de patrones precisos de conectividad sináptica. Igualmente desencadena cambios duraderos en la eficacia sináptica, fenómenos conocidos como LTP (potenciación de larga duración, “long-term potentiation”) y LTD (depresión de larga duración, “long-term depression”), que se consideran el correlato celular de los procesos de aprendizaje y formación de la memoria.

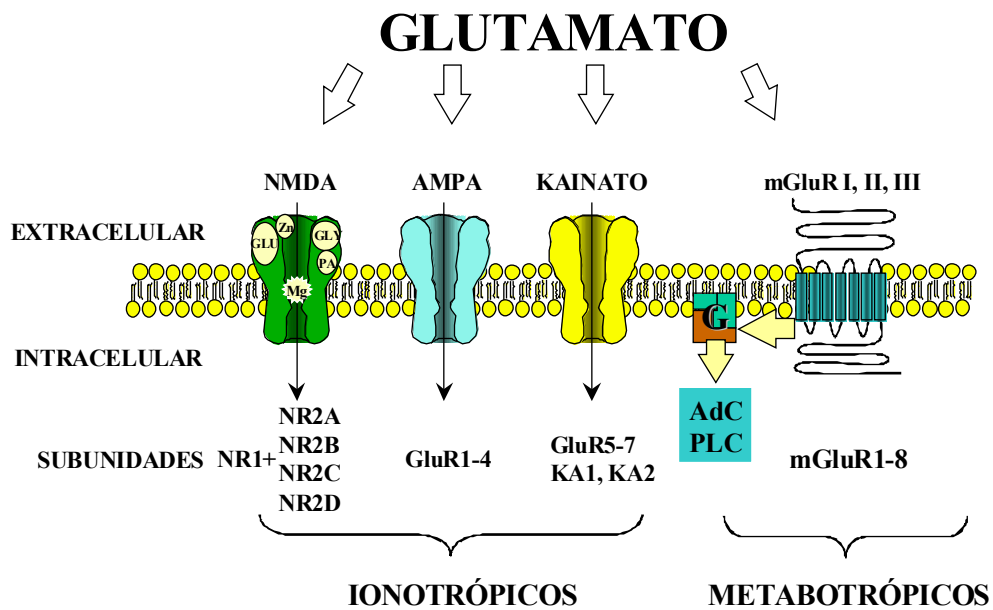
Además, alteraciones de la neurotransmisión glutamatérgica están implicadas en el daño neuronal observado después de episodios de isquemia y de hipoglucemia, así como en la etiología de una serie de estados neurológicos patológicos que incluyen la epilepsia y las enfermedades de Alzheimer, de Parkinson, la corea de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica.

El glutamato realiza sus funciones mediante la activación de varias moléculas receptoras. Los receptores que el glutamato activa se han dividido en dos familias: receptores metabotrópicos y receptores ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos (mGluRs) están acoplados a proteínas G (proteínas que unen GTP) y regulan la producción de mensajeros intracelulares (Pin y Duvoisin, 1995). Esta superfamilia está formada por 8 genes diferentes (mGluR1-8), cada uno de los cuales da lugar a distintos mRNAs por mecanismos de ajuste (splicing) alternativo. Según el nivel de conservación de su secuencia aminoacídica estos receptores se han subdividido en tres grupos (tipos I, II y III) (Nakanishi, 1992), con dos posibles mecanismos de transducción (adenilato-ciclasa y fosfolipasa C). Estos tres grupos presentan también propiedades farmacológicas propias. Por el contrario, los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) forman un canal catiónico con diferente selectividad iónica según el tipo de receptor, siendo permeables a sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y, en ocasiones, a calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Nakanishi, 1992; Hollmann y Heinemann, 1994).

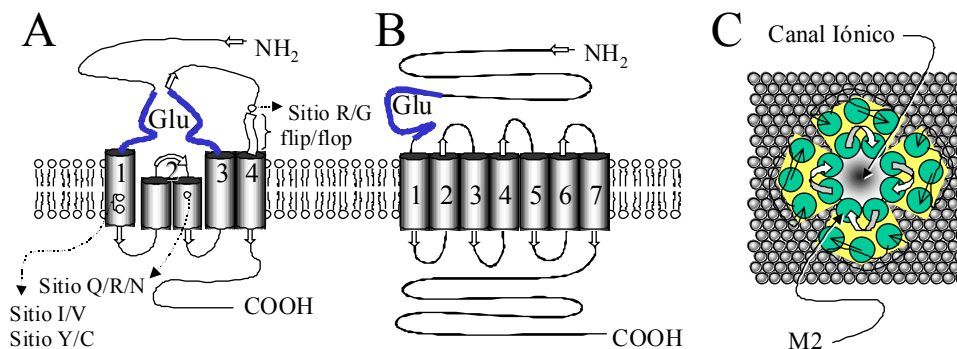
## **1. RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO.**

Se estima que en el SNC de los mamíferos, el glutamato es el neurotransmisor empleado en el 90 % de las sinapsis excitadoras rápidas, donde actúa sobre receptores ionotrópicos (iGluR). En función del agonista que produce la activación de éstos con mayor afinidad o selectividad, los receptores ionotrópicos de glutamato se han clasificado en tres tipos: receptores de NMDA (ácido N-metil-D-aspartico), receptores de AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) y receptores de kainato.

Desde el punto de vista molecular, los receptores ionotrópicos de glutamato son proteínas integrales de membrana formadas, probablemente, por cuatro subunidades que



**Figura 1.** Los receptores de glutamato se dividen en ionotrópicos (canales iónicos) y metabotrópicos (acoplados a proteínas G). Los receptores ionotrópicos se subdividen en función de su activación selectiva por los agonistas NMDA, AMPA y kainato. Por su parte, los metabotrópicos se subdividen con respecto a la homología de sus secuencias en los grupos I, II y III. En la figura se incluyen también los nombres de las subunidades conocidas a la fecha para cada uno de los diferentes tipos de receptor y, en el receptor de NMDA, se indican los diferentes sitios de modulación que se conocen. AdC, adenilato ciclasa; PLC, fosfolipasa C; PA, poliaminas.



**Figura 2. Topología de los receptores de glutamato.** A) Los tres tipos de receptores ionotrópicos poseen tres dominios transmembranales (1, 3 y 4) y un segmento hidrofóbico que se introduce en la membrana de manera incompleta (2) formando la pared del canal iónico. El sitio de unión del glutamato está formado por aminoácidos de la región N-terminal y del asa entre el tercero y el cuarto dominios transmembranales. También se muestra la posición de los diferentes sitios modificados por la edición y el procesamiento o ajuste alternativo de los RNA mensajeros que codifican estos receptores y que se discuten en el texto. B) Los receptores metabotrópicos poseen siete dominios transmembranales análogos a los observados en otras familias de receptores acoplados a proteínas G. El sitio de unión de glutamato está formado por aminoácidos del segmento N-terminal exclusivamente. C) La disposición en el plano de la membrana de las subunidades que conforman un receptor ionotrópico revela que se trata de un tetrámero en el que el segmento hidrofóbico M2 se ubica hacia el centro de la molécula formando el poro del canal.

forman un tetrámero (Rosenmund *et al.*, 1998). Estas subunidades son cadenas polipeptídicas de aproximadamente 900 aminoácidos ( $\approx 100$  KDa), las cuales están formadas por tres dominios transmembranales (M1, M3 y M4) y un dominio intramembranal (M2); con el extremo carboxiterminal intracelular y el aminoterminal situado en el lado extracelular. Se han identificado 28 subunidades distintas, codificadas por, al menos, 17 genes diferentes. Tal variedad se genera porque los RNAs pueden ser modificados mediante mecanismos de ajuste alternativo. Además, se conocen variantes generadas por edición del RNA, lo que incrementa el número de isoformas.

### 1.1. RECEPTORES DE NMDA.

De los tres tipos de receptores ionotrópicos de glutamato, el mejor conocido es el receptor de NMDA, debido sobre todo, a la rápida disponibilidad de ligandos selectivos, como el agonista NMDA (N-metil-D-aspartato) y los antagonistas D-AP5, MK801 o ketamina. Los receptores de NMDA son canales catiónicos que permiten el paso a su través de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Funcionalmente, se caracterizan por poseer una alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  (Ascher y Nowak, 1988), presentar dependencia de voltaje debida al bloqueo del canal por concentraciones fisiológicas de magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (Nowak *et al.*, 1984; Mayer y Westbrook, 1987), un tiempo de apertura largo (Nowak *et al.*, 1984) y una cinética de activación y de desactivación relativamente lenta (Lester *et al.*, 1990).

Además de los sitios de unión para el agonista, el receptor de NMDA presenta diversos lugares de regulación alostérica, que son diana para compuestos tanto endógenos como exógenos. Estos sitios de unión incluyen: un sitio de alta afinidad para glicina (Johnson y Ascher, 1987; Klecner y Dingledine, 1998; Lerma *et al.*, 1990); un sitio localizado en la luz del canal donde se unen el  $\text{Mg}^{2+}$  y moléculas como las fenciclidinas (PCP), el MK801, TCP o ketamina (Macdonald *et al.*, 1991; Lerma *et al.*, 1991); además de un sitio adicional en el que actúa  $\text{Zn}^{2+}$  inhibiendo las respuestas inducidas por el agonista de forma independiente de voltaje (Peters *et al.*, 1987; Westbrook y Mayer, 1987). Finalmente, es conocido que las poliaminas espermina y espermidina potencian de forma alostérica el receptor de NMDA (Lerma, 1992). Igualmente, se ha descrito que los receptores de NMDA son sensibles a altas concentraciones extracelulares de  $\text{H}^+$  (i.e. son sensibles al pH) (Traynelis y Cull-Candi, 1990) y son susceptibles a los estados de

oxidación-reducción (Aizenman *et al.*, 1989).

A nivel estructural estos receptores están formados por, al menos, dos tipos de subunidades: NR1 (Moriyoshi *et al.*, 1991) y NR2 (Monyer *et al.*, 1992; Meguro *et al.*, 1992). Esta última consta de cuatro isoformas, NR2A, NR2B, NR2C y NR2D. La subunidad NR1 presenta 8 variantes generadas por ajuste alternativo (Sugihara *et al.*, 1992; Nakanishi *et al.*, 1992), que tienen diferentes propiedades farmacológicas. Expresando en sistemas heterólogos la subunidad NR1 con cualquiera de las cuatro subunidades NR2, se obtienen receptores de NMDA con características funcionales similares a los nativos. La subunidad NR1 parece ser el constituyente común de los receptores de NMDA, puesto que ninguna de las cuatro subunidades NR2 es capaz de generar receptores funcionales por sí misma. Dependiendo de la subunidad NR2 que se ensamble, los receptores heteroméricos NR1-NR2 tienen características propias.

La subunidad NR1 se encuentra expresada en prácticamente todas las neuronas (Moriyoshi *et al.*, 1991) mientras que las distintas subunidades NR2 muestran patrones de expresión espacio-temporales característicos en el cerebro y en la médula espinal, sufriendo alteraciones durante el desarrollo (Watanabe *et al.*, 1992; Monyer *et al.*, 1994). Los receptores de NMDA están involucrados en procesos fisiológicos complejos del SNC. Además de participar en la transmisión normal de la información, la activación de los receptores de NMDA se requiere para la generación de algunas formas de LTP (Nicoll *et al.*, 1988). Igualmente, la alta permeabilidad a calcio de los receptores de NMDA hace que estos jueguen un importante papel en procesos de muerte celular por excitotoxicidad.

## **1.2. RECEPTORES DE AMPA.**

La familia de los receptores de AMPA está formada por cuatro subunidades que presentan una homología entre ellas del 68 al 75 %. Se denominan GluR1-4 o GluRA-D, según el criterio seguido por el grupo que las clonó. Cada una de las cuatro subunidades presenta dos variantes generadas por procesamiento alternativo de los mRNAs, denominadas “flip” o “flop”. Un determinante molecular importante para las propiedades de canal de los receptores de AMPA es el aminoácido situado en la posición 586 (sitio Q/R). En tres de las cuatro subunidades del receptor de AMPA (GluR1, 3 y 4) esta posición está ocupada por una glutamina (Q). Los canales formados por cualquiera de estas

subunidades presentan una marcada rectificación entrante: dejan pasar más corriente en sentido entrante (potenciales de membrana negativos) que en sentido saliente (potenciales de membrana positivos) y son significativamente permeables a calcio (Hollman *et al.*, 1991; Verdoorn *et al.*, 1991; Burnashev *et al.*, 1992). Por el contrario, la subunidad GluR2 presenta una arginina (R) en esta posición. Este cambio hace que estos receptores presenten rectificación saliente (dejan pasar más corriente a potenciales de membrana positivos que negativos) y no permeen calcio. La subunidad GluR2 es fenotípicamente dominante, determinando el comportamiento del canal.

De forma contraria a los receptores de NMDA, que poseen varios sitios de modulación, los receptores de AMPA carecen, aparentemente, de esta compleja farmacología. En 1990 se describió que la sustancia Aniracetam potenciaba las respuestas de quisqualato a través de los receptores de AMPA (Ito *et al.*, 1990). Investigaciones posteriores demostraron que una familia de compuestos, las benzotiodiacidas, eran capaces de reducir la desensibilización de los receptores de AMPA. En este sentido, los diazóxidos, clínicamente usados como antidepresivos, son un orden de magnitud más potentes que el aniracetan. El compuesto más efectivo de esta familia es la ciclodiácida que reduce notablemente la desensibilización rápida de los receptores de AMPA, aumentando las corrientes postsinápticas (Yamada *et al.*, 1993; Patneau *et al.*, 1993; Trussell *et al.*, 1993).

Los receptores de AMPA se distribuyen por todo el cerebro, existiendo cambios de expresión según la etapa del desarrollo y el tipo de subunidad. De forma general, estos receptores se encuentran altamente expresados en el hipocampo y en las capas superficiales de la corteza. Por el contrario, las capas profundas de la corteza y el caudado/putamen expresan niveles intermedios.

Además de participar en la transmisión rápida de la información sináptica, estos receptores también han sido involucrados en algunas formas de plasticidad sináptica. Asimismo, una excesiva entrada de calcio a su través en condiciones patológicas también contribuye a la muerte de las neuronas.

### **1.3. RECEPTORES DE KAINATO.**

El receptor de kainato es el componente del sistema de señalización de glutamato que

se ha mostrado más elusivo a los investigadores. La falta de herramientas farmacológicas específicas ha impedido la detección de este tipo de receptores en neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC), así como la determinación de sus papeles fisiológicos. Hasta la clonación de las subunidades que forman los receptores de kainato, la evidencia de su existencia como receptores independientes era inexistente y sólo recientemente se han definido los procesos en los que estos receptores están involucrados (Lerma, 1997a).

### **1.3.1. Biología molecular de los receptores de kainato.**

#### ***A. La familia de subunidades de receptores de kainato: GluR5-7, KA1 y KA2.***

La familia de subunidades que puede contribuir a la formación de receptores de kainato nativos se puede dividir en dos subfamilias. Una primera incluye las subunidades GluR5, GluR6 y GluR7 y muestran entre sí un grado de homología del 75-80 %. Todas estas subunidades generan canales funcionales homoméricos, conteniendo lugares de baja afinidad para la unión de kainato. La otra subfamilia la constituyen las subunidades KA1 y KA2, las cuales, aunque no forman canales homoméricos por sí mismas, generan lugares de alta afinidad para la unión de kainato cuando se expresan en células de mamíferos. Mientras que las secuencias aminoacídicas de estas subunidades muestran un grado de homología entre sí del 70 %, sólo presentan un 45 % de homología con las de la otra subfamilia. De forma similar a las subunidades de otros receptores de glutamato, las subunidades de los receptores de kainato se componen de aproximadamente 900 aminoácidos ( $\approx 100$  KDa) y tienen una topología de membrana similar a la descrita para las subunidades de los receptores de AMPA y de NMDA.

#### ***B. Distribución de las subunidades del receptor de kainato.***

Estudios de hibridación *in situ* han revelado que los receptores de kainato se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso. Sin embargo, los patrones de expresión de las distintas subunidades son bastante heterogéneos (Wisden y Seeburg, 1993; Bahn *et al.*, 1994). Así, el transcrito de GluR5 se encuentra presente sobre todo en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG), el subiculum, el núcleo septal, el córtex piriforme y cingulado así como en las células de Purkinje del cerebelo (Bettler *et al.*, 1990); GluR6 es abundante en las células granulares del cerebelo, en el giro dentado y en la región CA3 del hipocampo, al igual que en el estriado. La subunidad GluR7 está presente con bajos niveles en el cerebro pero, se expresa en particular en las capas profundas del córtex cerebral, el

estriado, y en las neuronas inhibitoras de la capa molecular del cerebelo. KA1 se restringe de forma casi exclusiva a la región CA3 del hipocampo, aunque también se expresa en bajos niveles en el giro dentado, en la amígdala y en el córtex entorrinal (Werner *et al.*, 1991). Por el contrario, el mensajero de KA2 se encuentra prácticamente en todos los núcleos del sistema nervioso.

Aunque las diferentes subunidades de los receptores de kainato están ya presentes a nivel embrionario, la expresión emerge durante el período postnatal. Así, la cantidad de mRNA de GluR5 alcanza un pico entre P0 y P5, y luego comienza a declinar hasta los valores adultos. Esto ocurre también con otras subunidades.

### **C. Diversidad estructural.**

Los receptores de kainato tienen la misma topología transmembrana y la misma estequiometría que los receptores de AMPA y de NMDA. Es decir, son tetrámeros en los cuales cada monómero lleva su propio lugar de unión y contribuye con una secuencia de aminoácidos específica a la formación del lumen del canal, llamado segmento M2. Ese segmento está compuesto por residuos hidrofóbicos que entran en la membrana formando una estructura en forma de horquilla. Además de esta secuencia hidrofóbica, cada subunidad posee tres segmentos transmembrana (M1, M3 y M4) distribuidos de tal forma que el dominio N-terminal de la proteína se sitúa extracelularmente y la región C-terminal está localizada intracelularmente (Hollmann *et al.*, 1994; Roche *et al.*, 1994; Taverna *et al.*, 1994; Wo y Oswald, 1994; Bennet y Dingledine, 1995). Por analogía con los datos disponibles para los receptores de AMPA, se supone que el sitio de unión a glutamato en los receptores de kainato está formado por residuos distribuidos entre el dominio N-terminal y el lazo extracelular existente entre los segmentos M3 y M4 (Stern-Bach *et al.*, 1994). Sin embargo, la estructura real del bolsillo de unión a kainato debe presentar diferencias significativas entre los distintos receptores de glutamato, que podrían ayudar a explicar, entre otras cosas, porqué los receptores de AMPA pueden unir kainato con alta afinidad mientras que algunos receptores de kainato no son capaces de unir AMPA.

Algunas subunidades de los receptores de kainato se presentan como isoformas generadas por ajuste alternativo (e.g. Sommer y Seeburg, 1992). La subunidad GluR5 fue inicialmente descrita en dos formas moleculares que difieren en la presencia (GluR5-1) o

ausencia (GluR5-2) de un fragmento de 15 aminoácidos en el extremo N-terminal (Bettler *et al.*, 1990). Análisis adicionales revelaron la existencia de dos formas moleculares adicionales para GluR2 (Sommer *et al.*, 1992), que difirieron en regiones del extremo carboxiterminal, por lo que la subunidad GluR5-2 puede presentar 3 regiones o dominios C-terminal diferentes. Estas isoformas se denominaron GluR5-2a (la más corta), GluR-2b y GluR5-2c (la más larga). Se desconoce si estas isoformas presentan el mismo comportamiento farmacológico, puesto que es la subunidad GluR5-2a la que se ha estudiado más, debido a que es la más eficiente a la hora de expresarse cuando se transfecta en células de mamíferos (Sommer *et al.*, 1992). La existencia de ajuste o procesamiento alternativo no se ha descrito para las subunidades GluR6, KA1 y KA2. Por el contrario, recientemente se ha descrito que la subunidad GluR7 existe en dos variantes generadas por ajuste alternativo del extremo C-terminal, denominadas GluR7a y GluR7b. (Schiffer *et al.*, 1997).

Aunque se ha demostrado que las variantes por ajuste alternativo de otros receptores de glutamato son fundamentales para la función del receptor, las implicaciones funcionales de estas variaciones de los receptores de kainato todavía están por determinar. Se podría hipotetizar que estas variantes con diferentes secuencias C-terminales podrían interactuar con diferentes proteínas del citoesqueleto dotando al receptor de un mecanismo de interacción diferencial con distintos sistemas de señalización (e.g. Nishimune *et al.*, 1998; Osten *et al.*, 1998; Ehlers *et al.*, 1996).

De forma similar a otros muchos receptores de neurotransmisores (ver Swope *et al.*, 1992 para revisión), las subunidades de los receptores de kainato contienen sitios consenso de fosforilación para diversas proteínas kinasas. Así, un residuo de serina en la posición 684 parece ser el principal sitio de fosforilación para la proteína kinasa A (PKA).

Se dispone de algunas subunidades clonadas de pollo, sapo o peces que no forman canales funcionales ni receptores heteroméricos con otras subunidades cuando se expresan en sistemas recombinantes. Estas subunidades han sido designadas proteínas que unen kainato (KBP, kainate-binding proteins), (ver Henley, 1994 para revisión).

La edición de los mRNA es una fuente de heterogeneidad molecular para

determinadas proteínas (Cattaneo, 1991; ver Sommer y Seeburg, 1992 para revisión). Las subunidades GluR5 y GluR6, pueden sufrir edición postranscripcional del mRNA en un sitio localizado en la posición 590 (GluR6) o 591 (GluR5), conocido como sitio glutamina/arginina (Q/R). Es conocido que las propiedades de rectificación de los receptores de kainato están controladas exclusivamente por el sitio Q/R, de forma análoga a lo observado para los receptores de AMPA (Herb *et al.*, 1992, Egebjerg y Heinemann, 1993; Köler *et al.*, 1993). La versión no editada codifica para una glutamina (Q) y muestra una clara rectificación entrante, mientras que la versión editada codifica para una arginina (R) en esta posición y no rectifica (Egebjerg y Heinemann, 1993). GluR6 puede sufrir también edición en dos sitios adicionales localizados en el primer dominio transmembrana, donde una isoleucina puede ser sustituida por una valina (sitio I/V) y una tirosina puede ser sustituida por una cisteína (sitio Y/C). La edición del RNA en estas posiciones tiene consecuencias funcionales en los canales GluR6 homoméricos. Se ha visto que la permeabilidad a calcio de los canales GluR6 es modulada por el sitio Q/R, cuando los sitios I/V y Y/C del primer dominio transmembrana están editados (Khöler *et al.*, 1993). El alcance de la edición es regulado durante el desarrollo. A diferencia de la subunidad GluR2 de los receptores de AMPA, una proporción significativa de subunidades de receptores de kainato no editadas está presentes tanto en el cerebro embrionario como en el adulto (Paschen *et al.*, 1997; Bernard y Khrestchatisky, 1994). Igualmente, se ha observado la edición parcial de las subunidades GluR5 en el sitio Q/R también en neuronas individuales de hipocampo de rata adulta (Mackler y Eberwine, 1993). Aproximadamente el 60 % de los mRNAs de GluR5 se encuentran editados en tejido adulto, mientras que para GluR6 la proporción encontrada es del 80 %.

### **1.3.2. Propiedades funcionales de los receptores de kainato.**

#### ***A. Propiedades biofísicas. Propiedades de los receptores de kainato a nivel de canal único.***

Los receptores homoméricos editados GluR6(R) y GluR5(R) presentan una conductancia unitaria del orden de femtosiemens. La edición del sitio Q/R altera de forma drástica la conductancia de canal único, en el sentido que la forma no editada (Q) presenta una conductancia unitaria mucho mayor. La combinación de las subunidades GluR5 (R) o GluR6 (R) con KA2 produce receptores heteroméricos que tienen 2-3 veces mayor

conductancia que sus respectivos homoméricos en la forma R, pero muestran menor afinidad por su agonista (Howe, 1996; Swanson *et al.*, 1996). Sin embargo, GluR6(Q)/KA2 presenta características de canal único que son indiferenciables de las que presentan los receptores homoméricos GluR6 (Q), aunque la coexpresión de KA2 y GluR5 (Q) acorta la duración de las respuestas cuando se compara con los canales homoméricos (Swanson *et al.*, 1996). Este efecto está de acuerdo con el hecho de que los mRNAs de las subunidades KA1 y KA2 no son susceptibles de ser editados y ambos llevan una Q en el lugar Q/R.

En células embrionarias de riñón (HEK) que expresan la forma Q de GluR5 o de GluR6 en receptores homoméricos (o heteroméricos con KA2), se realizaron registros de corrientes en la configuración de parches de membrana escindidos, que permitieron resolver tres niveles de subconductancias (Swanson *et al.*, 1996).

Recientemente, se ha descubierto que la corriente de canal único media de los receptores de glutamato también depende de cuántos de los sitios de unión para agonista están ocupados (Rosemund *et al.*, 1998) mientras el receptor no entre en estado desensibilizado.

### ***B. Propiedades de activación y de desensibilización de los receptores de kainato.***

Un sello de identidad de los receptores de kainato es que en presencia continuada del agonista, la corriente que fluye a través de los canales activados decae rápidamente. Ello se debe a la desensibilización del receptor. En neuronas de hipocampo en cultivo el desarrollo de la desensibilización sigue una curva exponencial única (Lerma *et al.*, 1993; Paternain *et al.*, 1998), aunque también se ha observado procesos que se ajustan mejor a una exponencial doble (Lerma *et al.*, 1993; Wilding y Huettner, 1997). La conclusión que permiten alcanzar los datos observados por algunos autores en diferentes preparaciones es que la desensibilización de los receptores de kainato es un proceso rápido y muy marcado. La desensibilización del receptor sigue una exponencial con una constante de tiempo de 11-13 ms tanto en neuronas de hipocampo como en canales GluR6 recombinantes (Lerma *et al.*, 1993; Paternain *et al.*, 1998). La velocidad de desensibilización estimada para receptores GluR6 en parches de membrana escindidos es más rápida (5-8 ms; Heckmann *et al.*, 1996; Traynelis y Wahl, 1997), pero no muy diferente a los valores medidos en condiciones de célula completa.

Por el contrario, la recuperación de la desensibilización de los receptores de kainato es muy lenta. La recuperación total de la respuesta inducida por glutamato en neuronas de hipocampo se obtiene después de 15 segundos de una aplicación inicial, aunque la velocidad de recuperación depende del agonista usado para desensibilizar el receptor (Paternain *et al.*, 1998). Es necesario esperar 1 minuto para recuperar la amplitud inicial en células de hipocampo, cuando se usa kainato para desensibilizar el receptor. En general la recuperación de la desensibilización sigue una exponencial simple, con una constante de tiempo que depende del tipo de subunidades que componen el receptor. Por ejemplo, los receptores homoméricos GluR5 cuando son desensibilizados con (S)-5-IW se recuperan en 2.5 minutos, mientras que los receptores heteroméricos GluR5/KA2 se recuperan de la desensibilización con una constante de tiempo de 12 segundos (Swanson *et al.* 1998). Independientemente del tipo de subunidad estudiada, estos datos implican que los receptores de kainato tienden a estar largos períodos de tiempo en el estado desensibilizado y que este estado puede ser considerado como un estado absorbente ya que el equilibrio está casi completamente desplazado en este sentido. El análisis de las curvas dosis-respuesta para el agonista endógeno, ya sea para receptores nativos o recombinantes, permiten concluir que los receptores de kainato no tienen una alta afinidad por glutamato. Sin embargo, en términos de desensibilización en el estado estacionario, los receptores de kainato son muy sensibles a la concentración ambiente de agonista. Estos receptores son aproximadamente dos órdenes de magnitud más sensibles al agonista para su desensibilización que para su activación.

El cálculo de la desensibilización en el estado estacionario para los receptores de kainato expresados por las neuronas de hipocampo en cultivo da un valor de  $IC_{50}$ , (i.e. la concentración de agonista a la cual el 50 % de los receptores se desensibilizan), de aproximadamente 3  $\mu M$  para glutamato (Paternain *et al.*, 1998). Esto significa que a concentraciones de glutamato incapaces de producir activación, los receptores están desensibilizados. Lo mismo ocurre cuando se usa kainato como agonista. Esta diferencia de sensibilidad entre activación y desensibilización también se encontró en receptores GluR6 recombinantes (Heckmann *et al.*, 1996; Paternain *et al.*, 1998). Curiosamente, los receptores GluR6 recombinantes son más sensibles a la desensibilización por glutamato ( $IC_{1/2}$  de 0.3  $\mu M$ ) que los nativos. Por el contrario, son menos sensibles a la activación por

glutamato ( $EC_{50}$  de 500-700  $\mu$ M).

### **C. Propiedades farmacológicas de los receptores de kainato.**

El principal obstáculo para el estudio de los receptores de kainato ha sido la falta de agonistas y antagonistas específicos. El desarrollo de agonistas y antagonistas específicos de los receptores de NMDA ha permitido determinar numerosos procesos en los cuáles estos receptores están involucrados. Sin embargo, la separación funcional de los receptores nativos de kainato y de AMPA en neuronas ha sido dificultosa ya que ambos receptores se activan por la misma colección de agonistas, y durante mucho tiempo se denominaron genéricamente receptores de tipo No-NMDA. Por ejemplo, el AMPA carece de efecto sobre los receptores de kainato recombinantes (Egebjerg *et al.*, 1991; Herb *et al.*, 1992) dado que es completamente inactivo sobre GluR6 y GluR7 y presenta una  $EC_{50}$  de 3 mM para GluR5 (Sommer *et al.*, 1992). De forma similar, AMPA no activa los receptores de kainato nativos en cultivos de neuronas de hipocampo, y sólo a altas concentraciones a los presentes en células de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de la médula espinal (Huettner, 1990; Lerma *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1994). Sin embargo, kainato, aunque con menor afinidad que para los receptores de kainato, activa todos los tipos de receptores de AMPA a dosis relativamente bajas.

#### **C.1. Agonistas.**

La afinidad de kainato por sus receptores varía según la composición de subunidades de los mismos. Los valores de  $EC_{50}$  calculados para las distintas subunidades en sistemas recombinantes corresponden a 33.6  $\mu$ M para GluR5 (Sommer *et al.*, 1992), 299  $\mu$ M para GluR6 (Paternain *et al.*, 1998) y  $>1$  mM para GluR7. Una situación similar se encontró cuando se usó glutamato como agonista (631  $\mu$ M para GluR5, 270-762  $\mu$ M para GluR6 y 5.9 mM para GluR7). Estos datos nos indican que los receptores de kainato no muestran alta afinidad ni por kainato ni por glutamato.

Además de kainato y glutamato, se han encontrado algunas moléculas capaces de activar los receptores de kainato con cierto grado de especificidad. El domoato, una toxina que se aisló de mejillones contaminados con algas, tiene 20-25 veces mayor preferencia por los receptores de kainato que por los de AMPA en células de DRG y en receptores GluR5 recombinantes (Huettner *et al.*, 1990; Sommer *et al.*, 1992), aunque es inactivo sobre

GluR7 (Schiffer *et al.*, 1997).

El ácido (RS)- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-tert-butil-4-isoxazolepropiónico (ATPA), un derivado de AMPA, ha sido descrito como agonista selectivo de receptores recombinantes GluR5. La  $EC_{50}$  para ATPA es 0.6  $\mu$ M para receptores nativos en neuronas de DRG y de 2.1  $\mu$ M para receptores GluR5 recombinantes, un orden de magnitud mayor que kainato (Clarke *et al.*, 1997). Al mismo tiempo su afinidad por los receptores de AMPA es unas 500 veces más baja.

El derivado de willardina, (S)-5-iodo-willardina, muestra una selectividad de unas 130 veces mayor para los receptores de kainato que para los de AMPA. Su  $EC_{50}$  es 140 nM.

## **C.2. Antagonistas.**

La búsqueda de antagonistas de los receptores de kainato no ha sido tan exitosa como la búsqueda de agonistas. La primera generación de antagonistas de los receptores de glutamato de tipo No-NMDA, las quinoxalinodionas (CNQX; DNQX y NBQX), son incapaces de discriminar entre los receptores de AMPA y los de kainato. El compuesto denominado NS102, otro antagonista de receptores de tipo No-NMDA, fue descrito como un producto que, en membranas de corteza, inhibe completamente la unión de kainato (Johansen *et al.*, 1993). Además, NS102 antagoniza parcialmente las respuestas generadas por activación de receptores GluR6 en células embrionarias de riñón (HEK) con un  $IC_{50}$  de 2.2  $\mu$ M (Verdoorn *et al.*, 1994). Sin embargo, NS102 también es activo sobre los receptores de AMPA, aunque de forma menos potente. Por ello, esta droga se consideró ineficaz para separar las actividades mediadas por ambos receptores (Paternain *et al.*, 1996; Wilding y Huettner, 1996).

El desarrollo de las 2,3-benzodiazepinas como antagonistas de los receptores de AMPA (ver Vizi *et al.*, 1996 para revisión), y la posterior demostración de que estos compuestos son selectivos para estos receptores (Paternain *et al.*, 1995; Wilding y Huettner, 1995), ha sido crucial para el entendimiento de la función de los receptores de kainato. En particular GYKI 53655 (LY300168 según el código de Elli Lilly) es un antagonista no competitivo de los receptores de AMPA, capaz de bloquear completamente estos receptores a una concentración de 100  $\mu$ M. A esta concentración, no ejerce

antagonismo sobre los receptores de kainato, y por ello ha sido usado para desenmascarar las corrientes de kainato en neuronas maduras (Paternain *et al.*, 1995; Wilding y Huettner, 1997). Aunque GYKI 53655 es la mezcla racémica, presenta una  $IC_{50}$  de  $\sim 1\mu M$  para antagonizar los receptores de AMPA (Paternain *et al.*, 1995; Wilding y Huettner, 1997), siendo el isómero activo, LY303070, más potente.

Recientemente, se ha desarrollado una nueva serie de compuestos que muestran una diferente sensibilidad para los receptores de AMPA y de kainato. LY293558 inhibe GluR5 pero no GluR6. Sin embargo, este compuesto también antagoniza las respuestas mediadas por los receptores de AMPA (Bleakman *et al.*, 1996). Otro derivado, LY294486, muestra mayor selectividad para GluR5, y más recientemente se ha demostrado que el compuesto LY382884 es específico para antagonizar la unión a los receptores GluR5, no presentando afinidad significativa por las subunidades de los receptores de AMPA GluR1,2,3 ni por las de kainato GluR6, GluR7 y KA2 (Simmons *et al.*, 1998).

### 1.3.3. Papeles fisiológicos de los receptores de kainato.

La primera evidencia acerca de la existencia de receptores de kainato se obtuvo en el sistema nervioso periférico. Los primeros estudios mostraron que los nervios periféricos de la raíz dorsal de ratas inmaduras, específicamente las fibras de tipo C, se depolarizaban con kainato, un efecto que luego se observó que se debía a la inactivación de canales de sodio dependientes de voltaje (Davies *et al.*, 1979; Agrawal y Evans, 1986). Estudios posteriores demostraron que la aplicación de kainato en células disociadas de los DRG inducía respuestas que se desensibilizaban rápidamente (Huettner *et al.*, 1990), un efecto sorprendente puesto que, el conocido hasta ese momento, se correspondía con una respuesta a kainato sostenida debido a la activación de los receptores de AMPA por kainato. La posterior demostración de que los receptores de kainato producían respuestas desensibilizantes cuando se expresaban en sistemas heterólogos así como la localización de subunidades de receptores de kainato en células de DRG, condujeron a la aceptación de que las respuestas observadas se debían, efectivamente, a la activación de receptores de glutamato de tipo kainato. Este constituyó la primera evidencia de la presencia de receptores de kainato específicos.

La disponibilidad del GYKI53655 como antagonista selectivo de los receptores de

AMPA, hizo posible el estudio de la participación de los receptores de kainato en la transmisión sináptica excitadora. Los primeros experimentos en cultivos de neuronas de hipocampo indicaban que, al contrario que los de AMPA, estos receptores no participaban en la transmisión sináptica excitadora. Aunque se demostró que las neuronas estudiadas tenían receptores de kainato, no fue posible provocar corriente postsináptica alguna en presencia de antagonistas de los receptores de AMPA y de NMDA (Lerma *et al.*, 1997b). Sin embargo, estudios posteriores en rodajas de hipocampo han permitido identificar una serie de sinapsis donde los receptores de kainato parecen mediar una fracción pequeña de la corriente sináptica. En este sentido, se ha demostrado que se pueden inducir corrientes excitadoras postsinápticas (EPSCs) con características farmacológicas propias de los receptores de kainato en las sinapsis formadas por la fibras musgosas y las neuronas piramidales de CA3 (Castillo *et al.*, 1997; Vignes y Collingridge, 1997). Sin embargo, estas respuestas sólo se observan en circunstancias de actividad presináptica repetitiva y podrían reflejar disposición extrasináptica de los receptores.

La corriente inducida por estos trenes de estímulos está ausente en ratones a los que se les ha anulado el gen GluR6 (Mulle *et al.*, 1998), lo que indica que los receptores de kainato que contienen la subunidad GluR6 participan en la transmisión sináptica a nivel fibra musgosa-neurona de CA3. Además del hipocampo, se ha identificado la presencia de receptores postsinápticos de kainato en neuronas de la amígdala lateral (Li y Rogawski, 1998), en neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Li *et al.*, 1999) (posiblemente implicados en nocicepción), en algunas células bipolares de la retina (DeVries y Schwartz, 1999) y en el córtex cerebral (Kidd e Isaac, 1999).