
Canales activados por glutamato

J. Lerma, A.V. Paternain, N. Salvador,
F. Somohano, M. Morales y M. Casado

Departamento de Plasticidad Neural. Instituto Cajal.
Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.

Introducción

En el sistema nervioso central (SNC), la gran mayoría de las sinapsis excitadoras usan aminoácidos como sustancias neurotransmisoras. Los receptores que los aminoácidos excitadores reconocen en la célula postsináptica no sólo median la transmisión normal de la información a este nivel, sino que también participan en la maduración de las conexiones sinápticas y en el crecimiento y la estructuración celular^{1,2}, actuando estos aminoácidos en este punto como auténticos factores tróficos. Además, la activación de los receptores glutamatérgicos puede conllevar la generación de fenómenos plásticos largamente duraderos como ocurre con la variación por el uso de la eficacia sináptica, inducible prácticamente de por vida. Este fenómeno está considerado la base celular de los procesos de aprendizaje³. No obstante, la sobreexcitación de ciertos receptores puede también mediar la degeneración neuronal y provocar la muerte celular. Esto significa que los mismos mecanismos fisiológicos, activados inapropiadamente, son suficientes para desencadenar la muerte de elementos neuronales, pareciendo existir una frontera sutil entre la función normal y la patología.

En los últimos años ha tenido lugar un avance considerable en el entendimiento de las propiedades de los receptores que posibilitan la transducción de la información en esas vías excitadoras. En este sentido, parecen existir, al menos, dos grandes familias de receptores con propiedades farmacológicas y funcionales diferentes. Una de ellas comprende los receptores que forman un canal iónico (receptores ionotrópicos), definidos por la acción depolarizante de agonistas selectivos: N-metil-D-aspartato (NMDA) y α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA), aunque el receptor de AMPA también puede ser activado por kainato*. Se ha podido determinar que ambos receptores pueden coexistir en la misma sinapsis^{4,5}. Un nuevo tipo de receptor ionotrópico para el ácido glutámico es un receptor ionotrópico insensible a AMPA, que

presenta desensibilización cuando se activa por kainato, quisqualato y glutamato. Este receptor ha sido descrito muy recientemente habiéndose denominado receptor «kainato-selectivo». La otra gran familia comprende receptores acoplados a proteína G, cuya activación provoca, en unos casos, la hidrólisis de fosfoinosítidos a IP3 y diacilglicerol⁷ y, en otros, la modulación de los valores de cAMP^{8,9}. Son los receptores de quisqualato tipo B o de ACPD (receptores metabotrópicos). Esta familia incluye lo que parece ser un autorreceptor de efecto inhibitor presináptico¹⁰, el receptor de AP4, del que se dispone de limitada información. En un tema en continua evolución, esta clasificación puede verse alterada a medida que el conocimiento sobre los receptores nativos progrese, teniendo en cuenta las nociones aportadas en los últimos años por el estudio de los diferentes tipos de receptores recombinantes expresados en sistemas de expresión exógena.

Caracterización de los receptores glutamatérgicos

El subtipo NMDA de receptor glutamatérgico es un canal catiónico operado por ligando que permite la permeación de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ y que posee diversos lugares susceptibles de modulación tanto por agentes endógenos como

* Debido a la falta de especificidad farmacológica de los antagonistas disponibles hasta la fecha y a que estos receptores son también activados por kainato, los receptores de AMPA son comúnmente referidos como receptores de AMPA/kainato. La evidencia de que existen receptores de glutamato que, siendo activados por kainato de forma peculiar, no reconocen AMPA (véase posteriormente) obliga a hacer una distinción entre receptores de AMPA y receptores de kainato todavía no suficientemente universal. Por ello, en el presente artículo denominaremos receptores de AMPA a aquellos receptores que son activados por AMPA, aunque también lo sean por kainato⁵.

exógenos. Estos lugares se corresponden con el sitio que reconoce al ligando endógeno, glutamato; un lugar de alta afinidad para glicina¹¹, que actúa *posibilitando* la apertura del canal inducida por el agonista^{12,13} y que es diferente del receptor inhibidor de glicina, sensible a estricnina; un sitio o sitios dentro de la luz del canal, donde el Mg^{2+} y las fenciclidinas (PCP, ketamina, MK-801) se unen para producir el bloqueo del canal una vez abierto, fenómeno dependiente del potencial de membrana¹⁴⁻¹⁷. Un sitio adicional lo representa el lugar donde el Zn^{2+} actúa para inhibir alostéricamente la respuesta a NMDA^{18,19}. Igualmente, se ha descrito la sensibilidad del receptor de NMDA a la concentración extracelular de $H^{+20,21}$, así como al estado redox celular²². Más recientemente, se ha descrito la existencia de un lugar donde las poliaminas endógenas espermina y espermidina se unirían para potenciar la respuesta a NMDA²³. Experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que esta potenciación se debe a un decremento del grado de desensibilización del receptor de NMDA y que las poliaminas reconocen un lugar situado en la cara extracelular del receptor²⁴.

Los experimentos llevados a cabo durante los últimos años con técnicas de biología molecular han conducido a la clonación de las subunidades que deben conformar in vivo los receptores para glutamato. Ello ha puesto de manifiesto la existencia de varias subfamilias de subunidades. Las múltiples combinaciones de estas subunidades en dosis todavía no conocidas darían lugar a la gran diversidad funcional que los receptores de glutamato presentan. En este sentido, es posible obtener receptores funcionales de NMDA con propiedades similares a las descritas con respuestas nativas por ensamblaje heteromérico de dos tipos de subunidades, la NR1²⁵ y cada una de las 4 subunidades NR2 (NR2A-D)²⁶. La subunidad NR1 aparece en siete formas diferentes generadas por procesamiento diferencial de los ARN²⁷, otorgando cada una de ellas al heterómero propiedades farmacológicas peculiares. La subunidad NR1 es ubicua en el SNC mientras que las NR2 poseen un carácter modulador, dado que los receptores recombinantes de NMDA adquieren características funcionales diferentes de acuerdo a la subunidad NR2 que se ensamble con NR1^{26,28}. Además, las subunidades NR2 presentan perfiles diferentes de expresión espacial y temporal en el desarrollo, generando diversidad funcional en las distintas poblaciones neuronales del SNC²⁸.

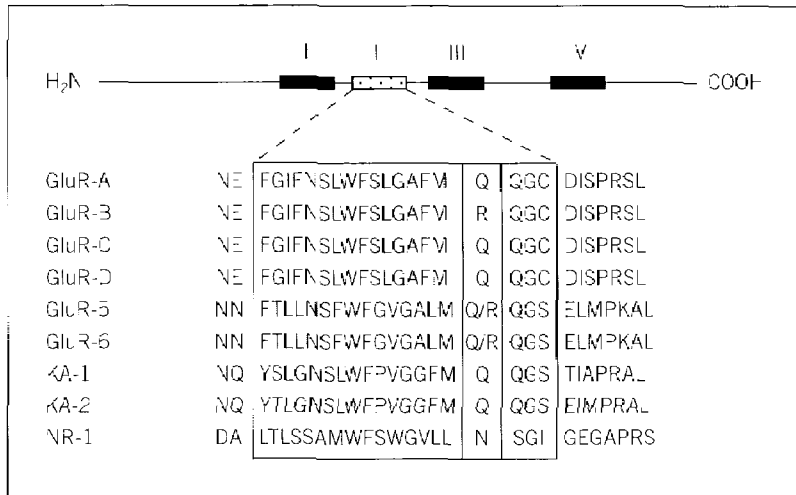
En términos de papel funcional, está ampliamente reconocido que los receptores de AMPA median la mayor parte de la transmisión sináptica excitadora de tipo rápido²⁹. La familia de los receptores AMPA comprende 4 subunidades altamente homólogas (GluR1-4)³⁰. Estudios farmacológicos y electrofisiológicos con receptores recombinantes de AMPA expresados en líneas celulares o en oocitos de *Xenopus* han demostrado que este receptor posee una alta afinidad por AMPA y que este análogo de glutamato desencadena respuestas similares a las registradas en células pertenecientes al SNC³¹. Igualmente, han demostrado que este receptor, y el canal iónico que forma, es activado por kainato generando respuestas no desensibilizantes. La falta de agonistas específicos hace dificultosa la distinción funcional con otros receptores, lo que ha llevado a cuestionar la existencia, por ejemplo, de receptores de kainato específicos y de AMPA específicos en el SNC.

Igualmente, se ha propuesto que las familias compuestas por KA1 y KA2 y por GluR5, GluR6 y GluR7 representan las subunidades de los receptores de kainato de alta afinidad³²⁻³⁴ y que in vivo los distintos receptores podrían estar compuestos por estas subunidades asociadas de forma heteromérica. Sin embargo, y a pesar de algunas evidencias autorradiográficas y datos de unión de radioligandos³⁵, la demostración de la existencia de este tipo de receptores en forma funcional en membranas nativas ha sido ardua. No obstante, muy recientemente, nuestro laboratorio ha podido demostrar, utilizando técnicas de *patch-clamp* y perfusión rápida, que un alto porcentaje de neuronas hipocámpicas en cultivo expresan receptores de glutamato que son selectivos para kainato⁶. Estos receptores sufren una profunda y rápida desensibilización y, aunque son activados por glutamato, quisquialato y domoato, no son sensibles a AMPA. Estos resultados han provisto la primera evidencia acerca de la existencia en células nerviosas de receptores funcionales de este tipo, dando lugar a la pregunta de cuál es su función en el SNC.

Canales iónicos activados por glutamato

Quizás uno de los resultados más sorprendentes que la expresión y la caracterización de las distintas subunidades han proporcionado es la constatación de que el receptor de AMPA, en determinadas configuraciones, muestra una llamativa permeabilidad a $Ca^{2+36,37}$. Era universalmente aceptado que el incremento citoplasmá-

Fig. 1. Topología propuesta para las distintas subunidades de los receptores de glutamato. Parece que tanto el extremo amino como el carboxiterminal se encuentran focalizados extracelularmente. Los rectángulos numerados I-IV representan los segmentos transmembrana, postulados a partir de estudios de hidrofobicidad. En la parte inferior se muestran alineadas las secuencias aminoacídicas correspondientes al segundo segmento transmembrana (zona sombreada) de varias subunidades. Se postula que este segmento forma parte de la pared del canal iónico. En algunas subunidades, como GluR-B, GluR-5 y GluR-6, el «sitio Q/R» presente en el segundo segmento transmembrana (sombreado claro) puede estar ocupado por glutamina (Q) o arginina (R) debido a fenómenos de editaje del ARNm. En cerebro de rata se ha comprobado que mientras que prácticamente el 100% del ARNm que codifica para GluR-B se encuentra editado (posee un codón para R), sólo el 30% del ARNm para GluR-5 presenta un codón editado, porcentaje que es aproximadamente del 75% en el caso de GluR-6³². En las subunidades del receptor de NMDA (NR-1, NR-2A, -2B, -2C y -2D) la posición homóloga al sitio Q/R está ocupada por una asparragina (N). Este sitio es crítico en todas las subunidades y determina en gran medida la permeabilidad iónica del canal.



Se postula que este segmento forma parte de la pared del canal iónico. En algunas subunidades, como GluR-B, GluR-5 y GluR-6, el «sitio Q/R» presente en el segundo segmento transmembrana (sombreado claro) puede estar ocupado por glutamina (Q) o arginina (R) debido a fenómenos de editaje del ARNm. En cerebro de rata se ha comprobado que mientras que prácticamente el 100% del ARNm que codifica para GluR-B se encuentra editado (posee un codón para R), sólo el 30% del ARNm para GluR-5 presenta un codón editado, porcentaje que es aproximadamente del 75% en el caso de GluR-6³². En las subunidades del receptor de NMDA (NR-1, NR-2A, -2B, -2C y -2D) la posición homóloga al sitio Q/R está ocupada por una asparragina (N). Este sitio es crítico en todas las subunidades y determina en gran medida la permeabilidad iónica del canal.

tico de Ca^{2+} en respuesta a glutamato se debía a la apertura de receptores de NMDA, o a la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en respuesta a la despolarización que el glutamato provoca. Los estudios de biología molecular han demostrado que se pueden obtener diversos tipos de receptores funcionales de AMPA por combinaciones de las subunidades GluR-A, -B, -C y -D (también denominadas GluR1-4)^{30,36} (fig. 1). La expresión de estas subunidades ha puesto de manifiesto que el Ca^{2+} puede permear aquellas formaciones homoméricas o heteroméricas que carecen en su composición de la subunidad GluR-B^{35,37}. Otro hecho llamativo es que en ausencia de GluR-B, las corrientes mediadas por los receptores de AMPA presentan una marcada rectificación en dirección entrante. Por el contrario, receptores que poseen la subunidad GluR-B en su composición carecen de rectificación entrante y no presentan permeabilidad al Ca^{2+} ³⁸. Estos resultados indican que la presencia de GluR-B determina tanto el comportamiento voltaje-dependiente del heterómero como la permeabilidad al Ca^{2+} del canal funcional. Experimentos de mutagénesis dirigida han demostrado que el responsable de

este comportamiento es un único aminoácido situado en el segundo segmento transmembrana y que se origina por editaje del ARNm^{39,40}. En la subunidad GluR-B, este residuo es arginina (R), mientras que en los GluR-A, -C y -D, este puesto está ocupado por glutamina (Q) (fig. 1). Este sitio, denominado «Q/R», es crítico en el funcionamiento de todos los canales operados por glutamato ya que en todas las subunidades de los receptores de NMDA el aminoácido presente en el lugar homólogo, una asparragina, controla igualmente la permeabilidad del canal al Ca^{2+} y el bloqueo por el Mg^{2+} ⁴¹.

Dada la importancia que la existencia o no de esta vía de entrada del Ca^{2+} a través de los receptores de AMPA puede tener en la función neuronal y lo que de ello se pudiera derivar en términos de participación en fenómenos plásticos y/o excitotóxicos, decidimos examinar la forma de las relaciones corriente-voltaje (I/V) y evaluar la permeabilidad al Ca^{2+} de los receptores de AMPA expresados por las células hipocámpicas en cultivo (fig. 2). Estos resultados se extendieron a neuronas hipocámpicas, disociadas agudamente a partir de individuos jóvenes, que

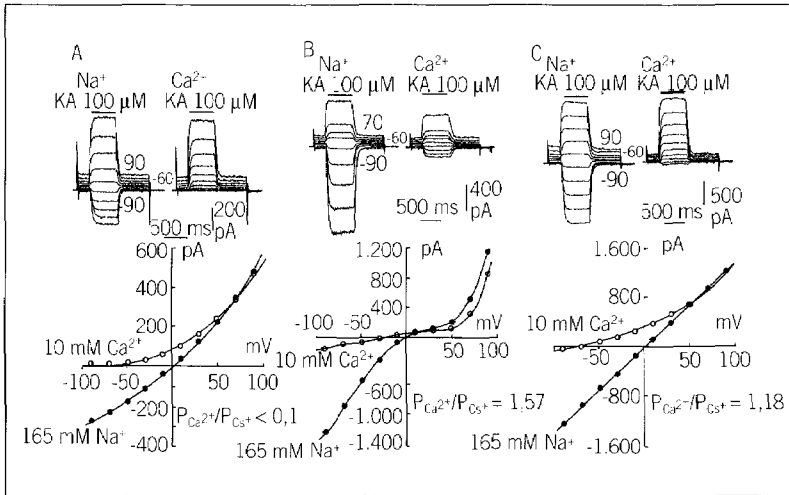


Fig. 2. Propiedades de las corrientes activadas por kainato actuando en los receptores de AMPA en neuronas hipocámpicas mantenidas en cultivo. En la parte superior de la figura (de A a C) se muestran las respuestas provocadas por perfusión rápida de kainato (KA) a varios potenciales de membrana cuando la solución extracelular contuvo Na^+ (registros rotulados Na^+) o cuando, en ausencia de Na^+ , el Ca^{2+} fue el único ion responsable de la corriente entrante (registros rotulados Ca^{2+}).

El protocolo seguido fue el siguiente: el potencial de membrana se varió desde -90 hasta $+90$ mV en pasos de 20 mV. El potencial de reposo entre pulsos fue de -60 mV. Se aplicó Kainato a concentración constante durante $0,6$ s (barra horizontal) en cada valor de potencial. En la parte inferior de cada caso se muestra la relación I/V, calculada tras la sustracción de la corriente de pérdida correspondiente. Las líneas son polinomios de segundo (A y C) o cuarto (B) orden ajustados a los valores de amplitud. Las respuestas inducidas por kainato, actuando sobre los receptores de AMPA, pueden ser clasificadas en rectificadoras en sentido saliente y no permeables a Ca^{2+} (A), rectificadores en sentido entrante y permeables a Ca^{2+} (B) y aproximadamente lineales, con baja, aunque no despreciable, permeabilidad a Ca^{2+} . La razón de permeabilidad $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Cs}^+}$ calculadas según la ecuación de campo constante, está indicada en cada célula. Tomada de Lerma et al.⁴².

al conservar la polaridad estructural nos permitieron estudiar la distribución topológica de los receptores en el eje somatodendrítico. Los receptores de AMPA se activaron con kainato, puesto que este agonista no desensibiliza dichos receptores, permitiendo estudiar las corrientes en condiciones estacionarias. Con este estudio⁴² se demostró que, aunque la mayoría (52,2%) de las células en cultivo expresan receptores de AMPA que carecen de permeabilidad a Ca^{2+} (fig. 2A), existe un número significativo de neuronas en las que la activación de estos receptores puede conllevar una entrada de Ca^{2+} muy sustancial. De este último grupo hay que distinguir un pequeño porcentaje (6,6%) que presentan respuestas a kainato con una clara permeabilidad al Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Cs}^+}=0,9$) (fig. 2B). No obstante, no se encontraron permeabilidades al Ca^{2+} tan altas como las descritas para receptores de AMPA recombinantes y, en todo caso, fueron menores que las estimadas en las mismas condiciones para los receptores de NMDA ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Cs}^+}=5,8$). Las células que mostraron mayor permeabilidad al

Ca^{2+} presentaron una relación I/V con rectificación entrante, aunque no completa. El 41% de las células estudiadas presentaron una curva I/V aproximadamente lineal y una permeabilidad al Ca^{2+} baja, aunque no despreciable ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Cs}^+}=0,18$) (fig. 2C). En todo caso, se pudo comprobar la existencia de una correlación entre el grado de rectificación entrante y el grado de permeabilidad al Ca^{2+} .

Esto lleva a la conclusión de que las células hipocámpicas deben expresar los dos tipos de receptor de AMPA con propiedades de rectificación opuestas y, por consiguiente, con baja y alta permeabilidad al Ca^{2+} . Ello haría posible la existencia de rectificación incompleta en las curvas I/V, así como una permeabilidad al Ca^{2+} graduada a nivel celular a través de los receptores de AMPA.

Aunque la existencia de subunidades de receptores de AMPA aún desconocidas no se puede descartar, esta última conclusión es especialmente atractiva puesto que implica que receptores de AMPA permeables y no permeables a Ca^{2+} (es decir, que contienen y que ca-

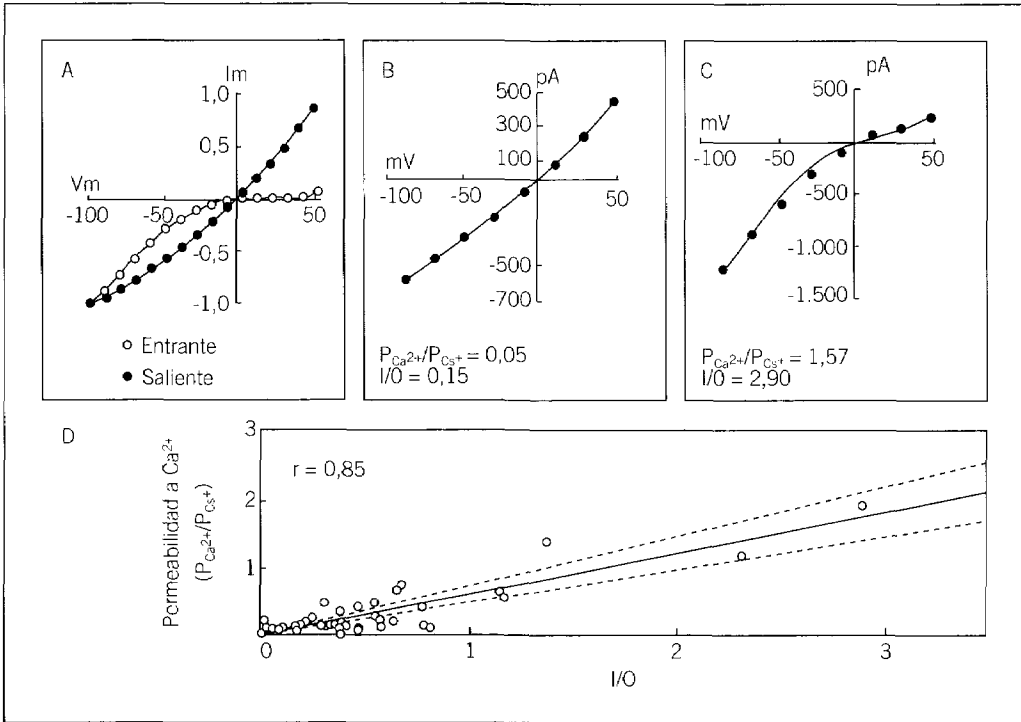


Fig. 3. Modelado de las relaciones I/V de los receptores de AMPA. A: relaciones I/V en 2 células prototípicas que muestran rectificación entrante (círculos) o saliente (triángulos). Los puntos representan los valores normalizados de corriente inducidos por kainato a cada valor de potencial de membrana. Las líneas representan un polinomio de cuarto grado (rectificación entrante) o de segundo grado (rectificación saliente) ajustado a los valores obtenidos en esas células. Estos polinomios fueron:

Entrante = $8,795 \times 10^{-3} x^4 + 1,073 \times 10^{-6} x^3 - 7,157 \times 10^5 x^2 + 9,306 \times 10^{-4} x$

Saliente = $4,867 \times 10^{-5} x^2 + 1,512 \times 10^{-2} x$

Los valores de corriente, obtenidos experimentalmente en 41 células que mostraban características mixtas, se ajustaron en cada caso con la función resultante de la suma de los polinomios indicados:

$I \bullet (\text{Entrante}) + O \bullet (\text{Saliente}) + \text{offset}$

donde I y O representan las amplitudes de cada función polinómica, y fueron los únicos parámetros (más el offset) que dejaron fluctuar libremente durante el proceso de ajuste. B y C muestran resultados representativos de ajustes en 2 células de características muy distintas. Los puntos son datos experimentales; las líneas representan el resultado del ajuste. La razón de permeabilidad $\text{Ca}^{2+}/\text{Cs}^+$, así como la razón de las amplitudes de cada polinomio (I/O), están indicadas en cada caso. D: correlación entre la razón de los componentes de entrada y salida estimados por ajuste y el grado de permeabilidad a Ca^{2+} , medido para cada una de las células (n=41). Se representan tanto la línea de regresión como el intervalo de confianza al 90% (líneas discontinuas). r es el coeficiente de correlación, que fue significativo al 99%. Tomado de Lerma et al⁶².

recen de GluR-B editada) coexisten en la misma célula en mayor o menor proporción. Para comprobar esta hipótesis se modeló la voltaje-dependencia de los receptores de AMPA permeables al Ca^{2+} mediante un polinomio de cuarto grado, que ajustó y representó perfectamente la curva I/V de las respuestas mediadas por los receptores de AMPA en una célula que presentó una fuerte rectificación entrante. Esta

función, así calculada, se tomó como prototípica de los canales de AMPA permeables al Ca^{2+} . Un polinomio de segundo grado, ajustado a una relación I/V con cierta rectificación saliente, sirvió para representar adecuadamente la curvatura de la relación I/V que típicamente presentan los receptores no permeables al Ca^{2+} (fig. 3A). Si ambos tipos de receptor coexisten en la misma célula y si para cada valor

de V_m su activación contribuye igualmente a la corriente total, la relación I/V para esa célula podría ser calculada por la suma ponderada de las funciones que explican el comportamiento de cada tipo de receptor. Las figuras 3B y 3C exponen el resultado de ajustar la suma de los 2 polinomios, calculados previamente, a los puntos obtenidos experimentalmente en 2 casos extremos. Los únicos parámetros libres en el ajuste fueron las amplitudes de cada función polinómica. Como puede verse, con este modelo es posible explicar relaciones I/V muy dispares, considerando únicamente la presencia relativa de cada componente. Esta fue cuantificada como la razón entre las amplitudes estimadas que definieron el componente rectificador de entrada y el de salida. Una comprobación ulterior de este modelo podría venir dada por la existencia de correlación entre el grado de permeabilidad al Ca^{2+} , medido previamente en cada una de las células analizadas, con la razón de las amplitudes estimadas para cada componente siguiendo el modelo. Efectivamente, la razón de amplitudes de los respectivos polinomios estuvo bien correlacionada con el grado de permeabilidad al Ca^{2+} , medido como la razón de permeabilidades Ca^{2+}/Cs^+ (fig. 3D). Este modelo tan simple demuestra que la rectificación graduada de las corrientes mediadas por activación de los receptores de AMPA es posible si receptores de uno y otro tipo son expresados por la misma célula. Igualmente, la existencia de poblaciones celulares que, teniendo una relación I/V lineal muestran una entrada sustancial de Ca^{2+} cuando se activan los receptores de AMPA, es posible. En este sentido, se han descrito acumulaciones relevantes de Ca^{2+} tras la activación de receptores de AMPA en células que presentaron una relación I/V prácticamente lineal⁴³⁻⁴⁵. De acuerdo a estas consideraciones, podemos afirmar que una permeabilidad celular relativamente baja al Ca^{2+} cuando se activan los receptores de AMPA no significa la existencia de receptores de AMPA parcialmente permeables al Ca^{2+} , sino que sólo unos pocos receptores de AMPA de los expresados por esa célula son permeables al Ca^{2+} .

La entrada de Ca^{2+} a través de los receptores de AMPA puede tener un gran significado funcional, particularmente allí donde los receptores de NMDA estén pobremente representados. Se ha demostrado recientemente que sinapsis carentes de receptores de NMDA presentan receptores de AMPA capaces de pasar corriente sólo en dirección entrante (rectificadores)⁴⁶. Estos receptores, como se acaba

de argumentar, deben ser permeables al Ca^{2+} . Aunque el ARNm para la subunidad GluR-B se colocaliza con ARNm codificantes para otras subunidades en la mayoría de las células hipocámpicas⁴⁷, la coexistencia de receptores de AMPA permeables y no permeables a Ca^{2+} puede ser un fenómeno ampliamente extendido. Por ejemplo, las células de Purkinje muestran una entrada de Ca^{2+} sustancial por activación de los receptores de AMPA, a pesar de que expresan grandes cantidades de ARNm para GluR-B⁴⁸. Aunque todavía no suficientemente valorado, las neuronas que expresen receptores de AMPA permeables al Ca^{2+} deben ser particularmente vulnerables a glutamato. Como la expresión de las diferentes subunidades que constituyen los receptores varía con el tiempo^{49,50}, el grado de susceptibilidad excitotóxica para diferentes poblaciones neuronales puede igualmente variar, ocasionando que ciertas áreas cerebrales sean más o menos susceptibles a los fenómenos excitotóxicos durante fases particulares del desarrollo.

Conclusiones

En resumen, los receptores para los aminoácidos excitadores, principalmente glutamato, no sólo median la transmisión sináptica normal, sino que también participan en diversos fenómenos fisiológicos e igualmente son los responsables de numerosos procesos neurodegenerativos. Por ello, el estudio de los receptores para los aminoácidos excitadores y el desarrollo de antagonistas que pudieran prevenir el daño excitotóxico es, en la actualidad, una de las áreas más activas de la neurobiología tanto básica como clínica. El conocimiento de la farmacología, la biofísica y los sitios de modulación de los receptores de glutamato es esencial para el desarrollo de fármacos específicamente dirigidos a influenciar y controlar su actividad, en la esperanza de que disminuyendo la estimulación excesiva y prolongada de los receptores de glutamato se atenuará la neurodegeneración que conllevan.

Agradecimiento

Los autores agradecen la ayuda de D. Guinea en la realización de estos trabajos, que han sido financiados por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PB89-0061) y el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (92/0266). F. Somohano disfrutó de una beca posdoctoral de la CEE y A.V. Paternain disfrutó de una beca Glaxo-CSIC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brewer GJ, Cotman CW. NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 1989; 99: 268-273.
2. Ranschecker JP, Hahn S. Ketamine-xylazine anaesthesia blocks consolidation of ocular dominance changes in kitten visual cortex. *Nature* 1987; 326: 183-185.
3. Nicoll RA, Kauer JA, Malenka RC. The current excitement in long-term potentiation. *Neuron* 1988; 1: 97-103.
4. Bekkers JM, Stevens CF. NMDA and non-NMDA receptors are colocalized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. *Nature* 1989; 341: 230-233.
5. Jones KA, Baughmann RW. Both NMDA and non-NMDA subtypes of glutamate receptors are concentrated at synapses on cerebral cortical neurons in culture. *Neuron* 1991; 7: 593-603.
6. Lerma J, Paternain AV, Naranjo JR, Mellström B. Functional kainate-selective glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11.688-11.692.
7. Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J, Weiss S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 1985; 317: 717-719.
8. Tanabe Y, Nomura A, Masu M, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J Neurosci* 1993; 13: 1.372-1.378.
9. Prezeau L, Manzoni O, Homburger V, Sladeczek F, Curry K, Bockaert J. Characterization of a metabotropic glutamate receptor: direct negative coupling to adenylyl cyclase and involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8.040-8.044.
10. Forsythe IG, Westbrook GL. Slow excitatory postsynaptic currents mediated by NMDA receptor on cultured mouse central neurones. *J Physiol* 1988; 396: 515-534.
11. Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurones. *Nature* 1987; 325: 529-531.
12. Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 1988; 241: 835-837.
13. Lerma J, Zukin RS, Bennett MVL. Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2.354-2.358.
14. Huettner JE, Bean BP. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1.307-1.311.
15. Lerma J, Zukin RS, Bennett MVL. Interaction of Mg^{2+} and phencyclidine in use-dependent block of NMDA channels. *Neurosci Lett* 1991; 123: 187-191.
16. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 1984; 309: 261-263.
17. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984; 307: 462-465.
18. Christie CW, Choi DW. Effect of Zinc on NMDA receptor channel currents in cortical neurones. *J Neurosci* 1990; 10: 108-116.
19. Westbrook GL, Mayer ML. Micromolar concentrations of Zn^{2+} antagonize NMDA and GABA responses on hippocampal neurones. *Nature* 1987; 328: 640-643.
20. Tang CM, Dichter M, Morad M. Modulation of N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H^+ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6.445-6.449.
21. Traynelis SF, Cull-Candy SG. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurones. *Nature* 1990; 345: 347-350.
22. Aizenman E, Lipton SA, Loring RH. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 1989; 2: 1.257-1.263.
23. Ransom RW, Stec NL. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem* 1988; 51: 830-836.
24. Lerma J. Spermine regulates N-methyl-D-aspartate receptor desensitization. *Neuron* 1992; 8: 343-352.
25. Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of rat NMDA receptors. *Nature* 1991; 354: 31-37.
26. Monyer H, Sprenger R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992; 256: 1.217-1.221.
27. Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S. Structure and properties of 7 isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 826-832.
28. Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M et al. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit. *J Biol Chem* 1993; 268: 2.836-2.843.
29. Gasic G, Heinemann S. Receptor coupled to ionic channels: the glutamate receptor family. *Curr Opin Neurobiol* 1991; 1: 20-26.
30. Keinänen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA et al. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 1990; 249: 556-560.
31. Sommer B, Burnashev N, Verdoorn TA, Keinänen K, Sakmann B, Seeburg PH. A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J* 1992; 11: 1.651-1.656.
32. Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C et al. Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5:

- expression in the nervous system during development. *Neuron* 1990; 5: 583-595.
33. Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* 1992; 8: 775-785.
 34. Sakimura K, Morita T, Kushiya E, Mishima M. Primary structure and expression of the $\gamma 2$ subunit of the glutamate receptor channel selective for kainate. *Neuron* 1992; 8: 267-274.
 35. Young AB, Fagg GE. Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 126-133.
 36. Holman M, Hartley M, Heinemann SF. Ca^{2+} permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 1991; 252: 851-853.
 37. Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 1992; 8: 189-198.
 38. Holman S, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann SF. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 1989; 342: 643-648.
 39. Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg P, Sakmann B. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 1991; 252: 1.715-1.718.
 40. Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 1991; 253: 1.028-1.031.
 41. Mori H, Masaki H, Yamakura T, Mishina M. Identification by mutagenesis of a Mg^{2+} -block site of the NMDA receptor channel. *Nature* 1992; 358: 673-675.
 42. Lerma J, Morales M, Ibarz JM, Somohano F. Rectification properties and Ca^{2+} permeability of glutamate receptor channels in hippocampal cells. *Eur J Neurosci* 1994. En prensa.
 43. Gilbertson TA, Scobey R, Wilson M. Permeation of calcium ions through non-NMDA glutamate channels in retinal bipolar cells. *Science* 1991; 252: 1.613-1.615.
 44. Brorson JR, Bleakman D, Chard PS, Miller RJ. Calcium directly permeates kainate/ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors in cultured cerebellar Purkinje neurons. *Mol Pharmacol* 1992; 41: 603-608.
 45. Zeilhofer HU, Muller TH, Swandulla D. Inhibition of high voltage-activated calcium currents by L-glutamate receptor-mediated calcium influx. *Neuron* 1993; 10: 879-887.
 46. McBain CJ, Dingledine R. Heterogeneity of synaptic glutamate receptors on CA3 stratum radiatum interneurons of rat hippocampus. *J Physiol (Lond.)* 1993; 462: 373-392.
 47. Mackler SA, Eberwine JH. Diversity of glutamate receptors subunit mRNA expression within live hippocampal CA1 neurons. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 308-315.
 48. Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J. AMPA receptors subtypes expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 1992; 9: 247-258.
 49. Pellegrini-Giampietro DE, Bennett MVL, Zukin RS. Differential of three glutamate receptor genes in developing rat brain: An in situ hybridization study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4.157-4.161.
 50. Sommer B, Seeburg PH. Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 291-296.

DISCUSIÓN

W. BUÑO: Usted ha realizado experimentos tomando tan sólo el calcio o el sodio como ion permeable. Quisiera preguntarle si existe alguna interacción cuando se colocan sodio y calcio juntos como iones permeables. Si existe interacción el modelo no va a funcionar, obviamente, ya que es un modelo lineal de suma de ajustes.

J. LERMA: Existe, efectivamente, interacción ya que se ha descrito que el calcio bloquea el receptor, o el canal de AMPA —y nosotros lo hemos comprobado también con el canal de kainato— lo que es extensible también al canal de NMDA. A la vez que permea, el calcio bloquea la corriente de sodio. En nuestro modelo no hemos utilizado 2 iones a la vez a la hora de determinar el grado de permeabilidad

a calcio o la razón de permeabilidades calcio/cesio, porque es absolutamente necesario asumir condiciones biónicas para poder determinar el grado de permeabilidad del calcio con fiabilidad. La presencia de 2 iones permeantes crea confusión y complica tremendamente las estimaciones.

B. SORIA: ¿Sabe si el magnesio citosólico desempeña algún papel en los procesos de rectificación que ha observado?

J. LERMA: Los registros se realizan en presencia de magnesio interno pero en su ausencia aparece también rectificación entrante. Aparentemente hay dos procesos de rectificación, uno de rectificación saliente y el otro se debe a una voltaje-dependencia de la desensibilización exclusivamente. Si se suprime la desen-

sibilización con ciclotiacida no hay rectificación saliente. Pero la rectificación entrante sí que puede tener un origen iónico aun cuando no sea el magnesio. Este es un hecho que está siendo objeto de debate.

- B. SORIA: En una de las diapositivas mostraba que el diazóxido afecta al sistema. Es una sustancia que abre canales de potasio. ¿El efecto que está mostrando es un efecto directo sobre el receptor o es un efecto a través de cambios del potencial de membrana?
- J. LERMA: En nuestro grupo no hemos trabajado con diazóxido. Fue la segunda sustancia después del aniracetam que se probó y sirvió para demostrar que el receptor de AMPA tenía un lugar de modulación alostérica. Trabajamos con ciclotiacida, que tiene los mismos efectos ya que es un diurético y su estructura es muy parecida, son benzotiadiazinas. No sé a qué concentraciones actúa sobre los canales de potasio, sobre los canales de AMPA actúa a concentraciones muy bajas del orden micromolar.
- J. LÓPEZ BARNEO: Querría volver a la interrelación sodio-calcio. En todas las curvas I/V que ha mostrado antes utilizaba soluciones con sodio (libres de calcio), o bien de calcio (libres de sodio). ¿Existen diferencias entre las curvas I/V de los receptores AMPA permeables y no permeables al calcio, si se utilizan concentraciones fisiológicas de estos iones? Por ejemplo, 140 mM de sodio y 2,5 mM de calcio.
- J. LERMA: No, a nivel macroscópico de célula completa. Es posible que exista a nivel microscópico, me refiero en términos de curva I/V de canal único.
- J. LÓPEZ BARNEO: Quisiera referirme a sus trabajos y a los de otros autores, que muestran que el receptor AMPA es permeable a calcio, ¿podría hacer un comentario sobre su posible localización dentro de una neurona?, ¿está distribuido uniformemente o cree que hay una distribución no uniforme en el soma, dendritas primarias y árbol dendrítico?
- J. LERMA: Esta cuestión nos la planteamos al observar estos resultados, y realizamos registros en células de hipocampo disociadas agudamente de animales posnatales, es decir, que mantienen la polaridad en el sentido que el soma es soma y la dendrita apical es la dendrita apical. Mediante perfusión localizada de la membrana neuronal a nivel del soma o a nivel de la dendrita proximal, o de la dendrita apical pudimos comprobar que en el soma hay menos rectificación que en la dendrita proximal, y en la dendrita proximal más que en el soma y en la dendrita apical, por lo que a partir de la correlación, grado de permeabilidad-grado de rectificación, se puede inferir que en la dendrita proximal existen más receptores permeables a calcio que en el soma, o que en la dendrita apical. Por tanto, sí que hay una localización, una topología a lo largo del eje somatodendrítico.
- J.E. ESQUERDA: En este contexto yo quisiera preguntar si alguien ha hecho la correlación entre la presencia de receptores AMPA permeables a calcio y la capacidad del AMPA para producir fenómenos de excitotoxicidad.
- J. LERMA: Las células de Purkinje que no expresan NMDA muestran una gran sensibilidad excitotóxica a AMPA. En presencia de glutámico la célula de Purkinje muere y esa muerte es inducida a través de receptores de AMPA. Antes de conocer que el receptor de AMPA era permeable a calcio se creía que la toxicidad se debía a fenómenos osmóticos o a la activación de canales de calcio voltaje dependientes, pero obviamente se trata de un efecto calcio dependiente, y es antagonizado por antagonistas de los receptores de AMPA.
- M. CRIADO: Usted ha presentado unas células que en un determinado porcentaje tienen unos receptores con unas características. ¿Es posible que durante el tiempo de cultivo de las células estos porcentajes se modifiquen?
- J. LERMA: Es una buena pregunta. Al realizar cultivos se están seleccionando unas células que crecen bien y no se tiene en cuenta las células que crecen mal. Sin embargo, el porcentaje de células permeables a calcio o con rectificación de entrada en cultivos neuronales realizados a partir de embriones fue muy parecido al porcentaje de células con rectificación de entrada encontradas en células posnatales disociadas agudamente.
- J. TAMARGO: Mi pregunta está relacionada con la que antes formuló el Dr. Soria; usted está observando el efecto de diazóxido que disminuye conductancia potasio y está observando el efecto de ciclotiacida, que al menos en las preparaciones que manejo también modifica en el mismo sentido la polaridad celular porque inhibe la conductancia calcio a través de canales L y T. Mi pregunta es: ¿tiene alguna forma de decirme qué conductancia modifican en esa preparación?
- J. LERMA: No vemos el efecto de estos fármacos sobre otros canales que no sean los canales de AMPA ya que trabajamos en condiciones de fijación de voltaje. Por tanto, no hay acti-

vación de canales voltajedependientes, aparte de los que estén activos en el potencial de membrana en reposo; además, si hubiera canales de potasio activos al potencial de membranas en reposo, los tendríamos bloqueados mediante el cesio añadido dentro de la célula. Únicamente observamos corriente de AMPA al poner AMPA. Por todo ello, no hay ninguna contaminación en lo que se refiere a la acción de ciclotiácida por activación o desactivación de otros canales.

V. CENA: Cuando se cultivan neuronas u otro tipo de células se producen muchos fenómenos de desensibilización que pueden modificar la distribución de receptores. En el caso del hipocampo una posibilidad de prevenir este efecto es realizar experimentos en rodajas, la pregunta es: ¿han hecho experimentos en rodajas de hipocampo? y, si la respues-

ta es afirmativa, ¿obtienen los mismos resultados?

J. LERMA: Nosotros no, pero otros grupos han llevado a cabo experimentos tratando de correlacionar las curvas I/V con la permeabilidad calcio. El resultado que han obtenido ha sido absolutamente negativo, no han encontrado permeabilidad del calcio ni rectificación entrante en parches tomados del soma. Sin embargo, ya he señalado que en el soma hay menos receptores permeables al calcio que en la dendrita, lo que podría ser la causa.

B. SORIA: En relación con la pregunta anterior, si estas sustancias actúan directamente sobre el receptor, ¿ha revisado si hay trozos de secuencias homólogas entre este receptor y lo que se sabe de canales de potasio?

J. LERMA: No, es un aspecto muy reciente.