

# Mecanismo de fototraducción de la melanopsina en las células ganglionares retinianas intrínsecamente fotosensibles (ipRGC)

Carlos Augusto Domínguez-Solís y Jorge Alberto Pérez-León\*

Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, Chih., México

## Resumen

*La melanopsina, presente en las ipRGC, es una proteína de membrana unida al cromóforo 11-cis-retinal que le permite responder a la luz mediante la vía de transducción característica de los receptores acoplados a las proteínas G. La secuencia de aminoácidos del fotopigmento es más semejante a las opsinas de los invertebrados que a las de los vertebrados. El mecanismo de fototraducción de las opsinas en los conos y bastones de los vertebrados se basa en su acoplamiento a la proteína G transducina, desencadenando una cascada de señalización que hiperpolariza a la membrana plasmática; en cambio, los fotorreceptores de los invertebrados activan la ruta de la proteína Gq, desembocando en la despolarización. Los estudios para dilucidar la fototraducción por melanopsina en expresión heteróloga, en la retina y en las células aisladas, indican la activación de la proteína Gq y la fosfolipasa C $\beta$ , y la participación de un canal iónico de la familia de los canales iónicos receptores de potencial transitorio canónico (TRPC).*

*Las ipRGC forman el tracto retinohipotalámico, la aferencia retiniana al núcleo supraquiasmático (NSQ), lo que las convierte en responsables de fotosincronizar al regulador maestro de los ritmos circadianos. Revelar su mecanismo de fototraducción repercutiría en la terapéutica de los trastornos cronobiológicos, entre ellos algunos trastornos del ánimo. (Gac Med Mex. 2015;151:764-76)*

**PALABRAS CLAVE:** Melanopsina. Retina. Ritmos circadianos. Fotosincronización. Cronobiología.

## Abstract

*Melanopsin is the most recent photopigment described. As all the other opsins, it attaches in the retina as chromophore. Its amino acid sequence resembles more invertebrate opsins than those of vertebrates. The signal transduction pathway of opsins in vertebrates is based on the coupling to the G protein transducin, triggering a signaling cascade that results in the hyperpolarization of the plasma membrane. On the contrary, the photoreceptors of invertebrates activate the Gq protein pathway, which leads to depolarizing responses. Phototransduction mediated by melanopsin leads to the depolarization of those cells where it is expressed, the intrinsically photosensitive retinal ganglion cells; the cellular messengers and the ion channel type(s) responsible for the cells' response is still unclear. Studies to elucidate the signaling cascade of melanopsin in heterologous expression systems, in retina and isolated/cultured intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, have*

### Correspondencia:

\*Jorge Alberto Pérez-León

Instituto de Ciencias Biomédicas

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Anillo PRONAF y Estocolmo, s/n

C.P. 32310, Ciudad Juárez, Chihuahua, Chih., México

E-mail: alberto.perez@uacj.mx

Fecha de recepción: 26-08-2014

Fecha de aceptación: 13-01-2015

provided evidence for the involvement of protein G<sub>q</sub> and phospholipase C together with the likely participation of an ion channel member of the transient receptor potential-canonical family, a transduction pathway similar to invertebrate photopigments, particularly *Drosophila melanogaster*.

The intrinsically photosensitive retinal ganglion cells are the sole source of retinal inferences to the suprachiasmatic nucleus; thus, clarifying completely the melanopsin signaling pathway will impact the chronobiology field, including the clinical aspects. (Gac Med Mex. 2015;151:764-76)

Corresponding author: Jorge Alberto Pérez León, alberto.perez@uacj.mx

**KEY WORDS:** Melanopsin. Circadian rhythms. Retina. Photoentrainment. TRPC channel.

## Introducción

Los ojos son los órganos sensoriales que tienen la función de llevar a cabo la visión, mediante la cual podemos percibir los objetos y sus movimientos, contrastos y colores. En los vertebrados el ojo está compuesto por la esclera, la córnea, la pupila, el iris, la lente, el cuerpo ciliar y la membrana coroide. De entre todos estos tejidos destaca en importancia la retina<sup>1</sup>, que se compone de seis clases de células nerviosas: los fotorreceptores, bastones y conos, y las interneuronas retinianas: células horizontales, bipolares, amacrinas y ganglionares (RGC)<sup>2</sup>, que son las neuronas de proyección hacia el encéfalo. Hay un subconjunto (1-2%) de estas últimas que produce la melanopsina, una opsina que confiere a estas células la capacidad de captar fotones a través del cromóforo retinal unido a su parte proteica<sup>3</sup>. De esta manera, las células actúan como un fotorreceptor adicional a los clásicos conos y bastones. Son ipRGC porque responden a estímulos de luz aun cuando son inhibidas las señales sinápticas provenientes de la red neuronal intrarretiniana, activada por los conos y bastones<sup>4</sup>, e incluso una vez que se aíslan de la retina. Las ipRGC se han encontrado en todos los vertebrados estudiados; en el ratón se han descrito cinco subtipos (M1-M5) y tres en la rata<sup>5</sup>. Su actividad como una tercera clase de fotorreceptor en la retina se da en procesos sin relación con la formación de imágenes, por lo que se conocen como funciones extravisuales de la retina<sup>3</sup>. Las opsinas pertenecen a la clase de receptores que se acoplan a las proteínas G triméricas para la transducción de señal<sup>6</sup> (GPCR). En el reino animal, las opsinas activan dos tipos de proteínas G; las de los fotorreceptores clásicos en los vertebrados se acoplan a la transducina (G<sub>t</sub>), que pertenece a la subfamilia G<sub>i/o</sub> (G<sub>i</sub>) y disminuye los niveles de nucleótidos cíclicos<sup>7</sup>. Las opsinas de los invertebrados activan la clase G<sub>q</sub> (G<sub>q/11</sub>), que se caracteriza por estimular a la enzima

fosfolipasa C (PLC) y por la generación de corrientes iónicas mediadas por los cambios del Ca<sup>2+</sup> intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)<sup>8,9</sup> y, por lo tanto, despolarizantes, al contrario de lo que ocurre en los conos y bastones. La secuencia de aminoácidos de la melanopsina tiene mayor similitud con las opsinas de los invertebrados que con las de los vertebrados<sup>10</sup>. Tal homología presume que su mecanismo de transducción es semejante al de los fotorreceptores de los invertebrados. Diversos estudios en sistemas de expresión heteróloga, en cultivos celulares y en la retina sugieren que la melanopsina utiliza el sistema de los fosfoinosítidos para llevar a cabo la transducción de la señal luminosa; sin embargo, todavía falta por comprobar o descartar la participación de diversas moléculas, incluyendo el efecto final en la cascada de señalización, el canal o canales responsables de generar un aumento del (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> subyacente a la generación de potenciales de acción. El objetivo del artículo es revisar los estudios para elucidar el mecanismo de fototraducción mediado por melanopsina.

## Melanopsina

En 1998, Provencio, et al. trabajaban con melanóforos de la rana *Xenopus laevis* para identificar la opsina implicada en la migración de los melanosomas hacia la superficie celular, un fenómeno provocado como consecuencia de la incidencia de luz. Lograron identificar una opsina, a la que llamaron melanopsina por su aislamiento a partir de esos melanóforos. Encontraron también que se expresaba en las células retinianas del anfibio. Además, determinaron que su secuencia de aminoácidos era más semejante a las opsinas de los invertebrados que a las opsinas visuales, como las que se presentan en los conos y bastones de los vertebrados<sup>11</sup>. Por lo tanto, sus resultados indicaron que este fotopigmento se expresaba tanto en tejidos no oculares como oculares y, por ende, se sugirió en su

momento que podría estar implicado en funciones foto-receptivas visuales y no visuales<sup>3,11</sup>. Dos años después, el mismo equipo descubrió que en el humano la melanopsina solamente se expresaba en el ojo, particularmente en la retina; allí su expresión se daba muy probablemente en las capas de las interneuronas amacrinas y de las células ganglionares<sup>12</sup>.

### Estructura de la melanopsina

La melanopsina es una proteína integral de membrana de 534 aminoácidos; tiene siete dominios transmembranales; el extremo amino terminal se encuentra en la región extracelular, mientras que el carboxilo terminal se sitúa en el citoplasma; presenta tres asas extracelulares, y la segunda y la tercera contienen un par de residuos de cisteína cuya función es estabilizar la estructura terciaria mediante enlaces disulfuro. Tiene también tres asas en la región citoplasmática, donde distintos aminoácidos son candidatos como sitios intracelulares de fosforilación, y en el séptimo dominio transmembranal se da la interacción con el cromóforo, el retinaldehído. A pesar de que la melanopsina fue identificada en los vertebrados, la secuencia de aminoácidos deducida es más semejante a las opsinas de los invertebrados, con las que comparte algunas similitudes estructurales; por ejemplo, en la tercera asa citoplasmática hay una inclusión del aminoácido Asn-225 por una Gly-223, inserción que determina la clase de proteína G que se activa por las GPCR, de los cuales las opsinas son una subfamilia<sup>11,13</sup>.

### Funciones

El impulso nervioso proveniente de los conos y bastones es transferido a través de señales sinápticas hacia las células ganglionares retinianas (RGC), cuyos axones forman el nervio óptico que proyecta hacia el encéfalo para la formación de imágenes. En cambio, las ipRGC que expresan melanopsina proyectan sus axones hacia el NSQ para regular la sincronización de los ritmos circadianos en respuesta a los niveles de luz del ambiente (fotosincronización)<sup>14</sup>. Otras funciones relacionadas con respuestas fóticas son la supresión de melatonina<sup>15,16</sup>, los reflejos pupilares (PLR)<sup>17-20</sup> y la modulación del sueño<sup>21</sup>. Por lo tanto, las ipRGC están involucradas en funciones relacionadas con procesos dependientes de la luminosidad ambiental pero no llevan a la formación de imágenes, y estas funciones se han denominado funciones extravisuales de la retina (Fig. 1).



**Figura 1.** Morfología de las células ganglionares con melanopsina en la retina de la rata. Cortes verticales de retina en los que se localizó la melanopsina por inmunohistofluorescencia. **A:** célula de tipo M1 con la ramificación dendrítica hacia los estratos superiores de la CPI. **B:** célula de tipo M2 en la que las dendritas se extienden a lo largo de los estratos inferiores de la CPI. Clasificación de acuerdo con (5). La fotografía es de los autores. OS: segmentos externos de fotoreceptores; CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme (sináptica) externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme (sináptica) interna; GCL: capa de células ganglionares; \*: células marcadas en las fotografías de fluorescencia. Anticuerpo políclonal de conejo contra melanopsina de Affinity Bioreagent; anticuerpo fluorescente: IgG chivo contra conejo acoplado a ALEXA488 de Molecular Probes.

### Mecanismo de transducción de señal (fototraducción)

La fototraducción visual es el mecanismo por el cual los fotones son absorbidos por los conos y bastones en la retina para traducirlos a un impulso nervioso que el cerebro pueda interpretar<sup>22</sup>. La melanopsina se expresa en todos los vertebrados que se han estudiado<sup>23</sup>, tanto en la retina como fuera del ojo, como es el caso de la rana *X. laevis*, donde se encuentra en los melanóforos dérmicos y en la retina; en los mamíferos solamente se ha encontrado en el tejido retiniano<sup>12,24</sup>, lo cual sin duda está determinado por el hecho de que los mamíferos son los únicos vertebrados con fotorrección restringida a los globos oculares. Con base

en esta evidencia, se podría suponer que este fotopigmento tendría una mayor similitud estructural y funcional con las opsinas de los conos y bastones de los vertebrados que con las de la retina de los invertebrados; sin embargo, ocurre lo contrario, ya que la melanopsina guarda una relación filogénica más cercana a las opsinas de los invertebrados, incluyendo su mecanismo de fototraducción<sup>25,26</sup>.

En el reino animal se presentan dos tipos de fotorreceptores: rhabdoméricos y ciliares. Los rhabdoméricos se encuentran primordialmente en los invertebrados, mientras que los ciliares son los de los vertebrados<sup>27</sup>. Ambos tipos de células fotorreceptoras utilizan opsinas que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), cuyas características se han delineado en párrafos anteriores<sup>28</sup>. En respuesta a la luz, las opsinas ciliares activan la proteína G trimérica transducina (Gt), la cual activa la enzima efectora fosfodiesterasa (PDE) de guanosín monofosfato cíclico (GMP), disminuyendo de esa manera los niveles de éste en el citosol y generando el cierre de canales iónicos activados por nucleótidos cílicos (CNG), con la consecuente hiperpolarización de la membrana plasmática. En cambio, la transducción visual realizada en los fotorreceptores rhabdoméricos utiliza el sistema de los fosfoinosítidos. La rodopsina rhabdomérica activa una proteína del tipo G<sub>q</sub>, activadora a su vez de la PLC. La PLC hidroliza al lípido de membrana, fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), y así genera dos segundos mensajeros: el sn-1,2 diacilglicerol (DAG), que permanece ligado a la membrana, y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), que se libera al citosol<sup>29</sup>. Estos productos actúan como segundos mensajeros directa o indirectamente sobre diversas proteínas<sup>22,30</sup>. En las ipRGC la respuesta por la absorción del fotón es la despolarización de la membrana plasmática junto con el incremento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, cuya vía de acceso aún está por definirse, no sin debate<sup>3,24,31,32</sup>. Se ha propuesto que es el resultado de la activación de un canal iónico de tipo TRPC<sup>3,24,31,32</sup> o por canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje (VGCC)<sup>33</sup>. El mecanismo de transducción de señal de melanopsina se ha comparado con el de *Drosophila* por la homología con la rodopsina de este invertebrado. En *Drosophila*, la absorción de luz por el fotorreceptor rhabdomérico inicia la prototípica cascada de señalización por la proteína G<sub>q</sub>, la PLC, el incremento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y la participación de los canales de potencial transitorio, incluso definidos por la investigación de este fenómeno en la mosca (receptores de potencial transitorio [TRP] y TRPL)<sup>27,30</sup>.

En los mamíferos, la subfamilia de canales iónicos TRP fue descubierta por la similitud estructural con los canales TRP en *Drosophila*<sup>34,35</sup>, que son canales catiódicos, que al activarse por estímulos físicos, metabolitos o GPCR despolarizan la membrana plasmática<sup>36,37</sup>. Los TRP están organizados en tres dominios principales: contienen seis  $\alpha$ -hélices transmembranales que forman el canal iónico; su grupo amino terminal se encuentra en el citosol y está implicado en las interacciones proteína-proteína, y su extremo carboxilo terminal es también sitio para las interacciones proteína-proteína. A su vez, los TRP se clasifican en las subfamilias C, V, M, A, P y ML. Muchos de éstos se expresan en las dendritas de neuronas sensoriales y tienen un rol importante en la transducción sensorial, como la visión y el dolor, entre otras. Los TRPC (denominados canónicos o clásicos) difieren del resto en que están implicados en dos funciones principales: la regulación del incremento del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y la despolarización de la membrana. Se han descubierto diversos TRPC, que se denominan TRPC1 al TRPC7. Además, se ha encontrado que los miembros de esta subfamilia son los más cercanos homólogamente a los canales TRP de *Drosophila*<sup>38-40</sup>.

### Estudios de expresión heteróloga

La población de células ganglionares que expresan melanopsina abarca del 1 al 3% de la población total de células ganglionares en las diferentes especies estudiadas<sup>2</sup>, lo cual dificulta su estudio. Una manera de contrarrestar la problemática es utilizando sistemas de expresión heteróloga que permitan sobreexpresar la proteína bajo estudio. Para ello se requieren tres elementos básicos: un gen que codifique la proteína foránea, un vector que permita transportarla y el hospedador donde será expresada la proteína de interés<sup>41</sup>. En la tabla 1 se muestran los trabajos realizados en sistemas de expresión heteróloga para esclarecer el mecanismo de fototraducción de la melanopsina.

En el primer estudio de expresión heteróloga con melanopsina (Tabla 1), se transfecaron líneas celulares C SV O-igin S-V40 (COS-1) con el gen de melanopsina (OPN4) y de la G<sub>t</sub> bovina, y se realizaron ensayos bioquímicos en membranas celulares. Se logró demostrar que la melanopsina ciertamente sí es un fotopigmento funcional capaz de interactuar y activar una proteína G<sup>42</sup>, a pesar de que ésta fuera normalmente utilizada por la rodopsina. Es de notar que entonces se esbozaba que la transducción de señal de la melanopsina estaría más relacionada con la activación de la proteína G<sub>q</sub> por su homología con las opsinas de los invertebrados. Sin

embargo, Weng, et al. reportaron que la misma rodopsina es activada por el receptor de glutamato metabotrópico de retina humana (hmGluR6), que no está relacionado con la familia de las opsinas<sup>43</sup>, lo que implica que las relaciones entre GPCR y proteínas G en sistemas de expresión heteróloga podrían resultar promiscuas.

Dos años después, en 2005, se demostró de nuevo la función de la melanopsina como fotopigmento en un sistema celular heterólogo. En vez de utilizar preparaciones de membranas<sup>42</sup>, en esta investigación se utilizaron células intactas (Tabla 1), con las cuales se encontró que la melanopsina podía interactuar con una proteína G y provocar la consecuente activación de un canal iónico. La respuesta ante los estímulos de luz fue eliminada por efecto de inhibidores de proteínas G como la suramina y el análogo no hidrolizable guanosín trifosfato gama azufre (GTPyS); sin embargo, se desconoce con qué tipo de familia de proteína G interactuó, ya que la línea celular utilizada en el estudio (neuro-2a) no expresa las clásicas proteínas G transducinas ( $G_{i/o}$ ). Asimismo, los autores utilizaron antagonistas de la PLC y de las proteínas cinasas A y C, y permanecieron intactas las respuestas a los estímulos luminosos. Lo que sí demostraron fue un aumento del  $[Ca^{2+}]_i$ , como resultado de la fotoactivación de melanopsina, el cual fue anulado en un medio carente de  $Ca^{2+}$  o por efecto de la tarsigargina, un inhibidor de los canales intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Para conocer la identidad del canal iónico, se sustituyó el  $Ca^{2+}$  por  $Na^+$ , junto con inhibidores de los VGCC, y las respuestas ante la luz no se vieron afectadas<sup>44</sup>. Tales resultados implicaron más al movimiento de  $Ca^{2+}$  desde los almacenes intracelulares que a las corrientes a través de la membrana en la generación de la respuesta a la luz por la fototrasducción de la melanopsina (*intrinsic light response [iLR]*).

En 2005 también se reportaron dos estudios que demostraron por primera vez la participación de las proteínas  $G_q$ , PLC y TRPC3 en la transducción de señal mediada por la melanopsina (Tabla 1)<sup>45,46</sup>. Las células humanas embrionarias de riñón (*Human Embryonic Kidney cells [HEK293]*), transfectadas con el OPN4 de ratón y estimuladas con luz, generaban cambios de voltaje de la membrana, que eran disminuidos o eliminados utilizando antagonistas específicos de la proteína  $G_q$  y de la PLC. Asociada a esta vía de señalización se encuentra presumiblemente la activación del TRPC3<sup>46</sup>. Se observaron resultados similares en otro sistema de expresión heteróloga, donde se inyectó ARNm de ratón para transfectar ovocitos de *X. laevis* (Tabla 1). En este caso se utilizaron anticuerpos específicos inhibitorios de la proteína  $G_{q/11}$  y de la

PLC, con lo que fue eliminada la respuesta intrínseca a la luz (iLR), mientras que en presencia de la toxina *Pertussis* (inhibidor específico de  $G_o$  y  $G_i$ ) las respuestas no fueron alteradas. De esta manera, se descartó la participación de las proteínas G de los fotorreceptores ciliares en la fototrasducción por melanopsina. La iLR se atribuyó a la activación del canal TRPC3, ya que, en presencia de un agente quelante de  $Ca^{2+}$  y de un inhibidor de los TRPC, se eliminaron las corrientes iónicas<sup>45</sup>. Los dos estudios proporcionaron las primeras evidencias de que la melanopsina utiliza una cascada de señalización basada en el sistema fosfoinosítido, de manera similar al utilizado por los fotorreceptores rabdoméricos.

Pese a la solidez de estas evidencias, un estudio realizado por el grupo de trabajo de Kumbalasiri mostró resultados contradictorios (Tabla 1), ya que el uso de lantano ( $La^{3+}$ ) para inhibir a los TRPC no eliminó la iLR; la remoción de  $Ca^{2+}$  extracelular con un agente quelante tampoco alteró el flujo intracelular de  $Ca^{2+}$ , mientras que la aplicación de tarsigargina (inhibidor específico de las bombas de  $Ca^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico), con la que se inhibe el flujo de  $[Ca^{2+}]_i$ , eliminó la respuesta. Con estos resultados, los autores descartaron como mínimo el canal TRPC3 como responsable del aumento  $[Ca^{2+}]_i$  en la fototrasducción por melanopsina, y se lo atribuyeron a los almacenes intracelulares del retículo sarco/endoplásmico<sup>47</sup>, conclusión semejante a la de Melyan, et al. con las células neuro-2a<sup>43</sup>.

Una de las investigaciones más recientes en sistemas de expresión heteróloga es la realizada por Bayles y Lucas en el año 2013 (Tabla 1). Los autores intentaron determinar si la melanopsina de humano era capaz de activar las proteínas de las familias  $G_s$ ,  $G_{i/o}$  o  $G_q$  en células HEK293. Con el empleo de indicadores luminiscentes de AMP cíclico y de  $Ca^{2+}$  midieron las respuestas a los estímulos luminosos. En los ensayos observaron que los niveles del nucleótido disminuyeron como resultado de la estimulación luminosa, lo cual indicó que la melanopsina podía interactuar con la proteína  $G_{i/o}$ , mientras que los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) no aumentaron, descartando de esa manera la activación de la proteína  $G_s$ . Los autores midieron el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  para comprobar la activación de la proteína  $G_q$ . Las células transfectadas respondieron a los estímulos luminosos con un incremento, indicando la activación de la proteína  $G_q$  en la vía de señalización de melanopsina humana en células HEK293<sup>48</sup>.

Las mayorías de los resultados obtenidos en sistemas de expresión heteróloga para dilucidar el mecanismo de fototrasducción de la melanopsina han llegado a la

Tabla 1. Estudios en sistemas de expresión heteróloga con el OPN4

Autor (año)	Objetivo	Sistema de expresión heteróloga	Fuente de melanopsina	Método para medir la iLR	Resultados
Newman, et al. (2003)	Determinar si la melanopsina es un fotopigmento funcional	Línea celular COS-1	cADN de ratón	Ensayo bioquímico <i>in vitro</i>	Activación de proteína G transducina
Melyan, et al. (2005)	Determinar si la melanopsina induce fototraducción en otros sistemas celulares	Línea celular neuro-2a	cADN humano	Whole cell patch clamp	La melanopsina es un fotopigmento que activa una proteína G junto con la activación de un canal iónico
Qiu, et al. (2005)	Determinar si la melanopsina es un fotopigmento sensorial funcional	Células HEK293 (coexpresión con TRPC3)	cADN de ratón	Whole cell patch clamp	Activación de $G_q$ , PLC y TRPC3
Panda, et al. (2005)	Caracterizar la función de la melanopsina en la respuesta a la luz	Ovocitos de <i>X. laevis</i> (coexpresión con TRPC3)	mARN de ratón inyectado	Voltage clamp	Activación de $G_{q/11}$ , PLC y TRPC3
Kumbalasiri, et al. (2007)	Investigar la fuente de aumento de $(Ca^{2+})_i$ en la fotoactivación de melanopsina	Células HEK293 (coexpresión con TRPC3)	cADN humano	Imagen de calcio	El incremento de $(Ca^{2+})_i$ es mediado por los almacenes de $Ca^{2+}$ , y no por los canales TRPC3
Bayles y Lucas (2013)	Determinar la sensibilidad espectral y la selectividad a proteínas G	Células HEK293	cADN humano	Genes reporteros	Pico de absorción a 479 nm. Selectividad por $G_{q/11} > G_{i/0}$

Cos-1: línea celular de tipo fibroblasto derivada de tejido de riñón de mono; cADN: ADN complementario; neuro-2a: línea celular neuronal de ratón; HEK293: células embrionarias de riñón humano.

conclusión de que la vía de transducción implica muy probablemente a una proteína del tipo  $G_{q/11}$ , que a su vez activa la enzima efectora PLC, finalizando con la activación de un TRPC, lo cual permite el flujo intracelular de  $Ca^{2+}$  y despolariza la membrana plasmática<sup>44-46,48</sup>. A pesar de que la melanopsina tiene mayor similitud estructural y funcional con las rodopsinas de los invertebrados que con las de los vertebrados<sup>3,11,12</sup>, lo cual ha sugerido la vía común de señalización de los fosfoinosítidos<sup>27</sup> descrita antes<sup>49</sup>, dos estudios en sistemas de expresión heteróloga han demostrado que la melanopsina puede activar la familia de las proteínas G transducina ( $G_{i/o}$ )<sup>42,48</sup>. Sin ser concluyentes, hay evidencias para considerar que la melanopsina puede compartir la ruta de fototraducción de los fotorreceptores rhabdoméricos; los datos que implican similitudes con la fototraducción de los vertebrados quizás sean reflejo de que las GPCR pueden acoplarse promiscuamente a uno o a distintos subtipos de proteínas G<sup>50</sup>. Además, la asociación y activación de una proteína G *in vitro* no condiciona que ocurra lo mismo *in situ*.

### Estudios de fototraducción en cultivos primarios de ipRGC

Las investigaciones para descifrar el mecanismo de fototraducción de la melanopsina no se limitan a estudios en sistemas de expresión heteróloga, sino que abarcan también sistemas de cultivos celulares, estudios en la retina y en cultivos enriquecidos de células ipRGC aisladas. A continuación se describen las investigaciones realizadas en el estudio de este tópico (Tabla 2).

La secuencia completa de eventos moleculares subyacentes a la fototraducción por melanopsina se describió originalmente en melanóforos aislados de *X. laevis*, en la preparación de la cual precisamente fue descubierta esta opsina. Simultáneamente a la realización de varios estudios en sistemas de expresión heteróloga de diversos grupos internacionales (descritos en párrafos previos), en el año 2005 el grupo de Provencio, utilizando cultivos de melanóforos *X. laevis* (Tabla 2), midió la iLR de melanopsina por la dispersión de melanosomas. Con la aplicación de antagonistas

Tabla 2. Experimentos de la respuesta intrínseca a la luz en células aisladas e *in situ*

Objetivo	Modelo de estudio	Método para medir la iLR	Detección de ARNm	Antagonistas del sistema fosfoinosítido y/o proteínas G	Bloqueantes de TRPC y agentes quelantes de Ca <sup>2+</sup>	Detección por inmunofluorescencia	Resultados	Autores
Investigar si el mecanismo de fototraducción en las ipRGC se basa en el sistema fosfoinosítido	Cultivos de melanóforos dérmicos de <i>X. laevis</i>	Dispersión de melanosomas	OPN4	U73122	BAPTA-AM	N/A	Activación de PLC, producción de IP <sub>3</sub> , incremento de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> y activación de PKC	Graham, et al. (2008)
Determinar si las RGC de pollo son intrínsecamente fotosensibles y el tipo de mecanismo de fototraducción	Cultivos enriquecidos de RGC de pollo	Síntesis de melatonina radiactiva	OPN4 y G <sub>q</sub>	Neomicina y U73122	La <sup>3+</sup> , BAPTA-AM	N/A	Fototraducción mediada por G <sub>q</sub> , PLC e incremento de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> por un canal TRP y/o liberación de Ca <sup>2+</sup> de los almacenes intracelulares	Contín, et al. (2010)
Investigar la identidad del canal iónico activado en respuesta a la luz de RGC y la vía de señalización intracelular que lo lleva a su activación	Retina de rata (Sprague-Dawley)	Whole cell patch clamp	N/A	GTPgS y GDPbS	Rojo de rutenio, SK&F 96365, La <sup>3+</sup> y gadolinio (Gd <sup>3+</sup> ), BAPTA	TRPC6	Las ipRGC utilizan una proteína G para activar un TRPC, probablemente el TRPC6	Perez-Leighton, et al. (2011)
Investigar las tres posibles fuentes del incremento de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> en la iRL: TRPC, VGCC y almacenes intracelulares	Cultivos enriquecidos de ipRGC de rata (Long-Evans)	Imagen de calcio y <i>perforated patch clamp</i>	OPN4, TRPC 3, 6 y 7	N/A	2-APB, SK&F 96365, ácido flufenámico, lantánidos, inhibidores de canales activados por voltaje de Ca <sup>2+</sup> y de Na <sup>+</sup>	Melanopsina	El incremento de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> es mediado principalmente por los VGCC (90%) y minoritariamente por el TRPC7 (10%)	Xue, et al. (2011)

(Continúa)

Tabla 2. Experimentos de la respuesta intrínseca a la luz en células aisladas e *in situ* (Continuación)

Objetivo	Modelo de estudio	Método para medir la iLR	Detección de ARNm	Antagonistas del sistema fosfoinosítido y/o proteínas G	Bloqueantes de TRPC y agentes quelantes de $\text{Ca}^{2+}$	Detección por inmunofluorescencia	Resultados	Autores
Identificar un antagonista que inhibía la iLR de ipRGC	Retina de ratón (C3H) y mezcla de cepas (129/sv y C57BL/6)	Imagen de calcio	N/A	N/A	La <sup>3+</sup> , 2-APB, SK&F 96365, ácido flufenámico	TRPC6, 7	Los canales TRPC median la conductancia en las ipRGC. El 2-APB es un inhibidor <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de ipRGC	Isoldi, et al. (2005)
Investigar el mecanismo de fototraducción de la melanopsina	Cultivos enriquecidos de ipRGC de ratas (Sprague-Dawley)	<i>Whole cell patch clamp</i>	OPN4, familia de $\text{G}_{\alpha 11}$ ( $\text{G}\alpha 14$ , $\text{G}\alpha q$ , $\text{G}\alpha 11$ y $\text{G}\alpha 15$ ). Familia de PLC $\beta$ (PLCb1, 2, 3 y 4)	GDP $\beta$ S, GPAnt-2a y U73122	BAPTA	Melanopsina y PLC $\beta$ 4 (en retina)	La fototraducción en las ipRGC se basa en el sistema de los fosfoinosítidos asociado a la membrana plasmática	Contin, et al. (2006)
Investigar la participación del ciclo fosfoinosítido en la iLR de las ipRGC y si genera cambios en la actividad del IP <sub>3</sub> y en la PIP cinasa	Cultivos enriquecidos de RGC embrionarias de pollo	Imagen de calcio	OPN4m y OPN4x	U73122	N/A	Melanopsina	Las ipRGC activan la PLC, hay incrementos de IP <sub>3</sub> , se activa el ciclo PIP y se observa movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$	Warren, et al. (2006)
Identificar si los canales TRPC 3, 6 o 7 están implicados en la iLR de las ipRGC	Retina de líneas mutantes de ratón (C57BL/6 y 129/Sv) TRPC3 <sup>-/-</sup> , TRPC6 <sup>-/-</sup> y TRPC7 <sup>-/-</sup>	MAE y <i>whole cell patch clamp</i>	TRPC3, 6 y 7	N/A	N/A	Melanopsina	La despolarización en las ipRGC no es mediada por los canales TRPC3, 6 o 7 homoméricos. El TRPC6 puede estar implicado formando un canal heteromérico	Hartwick, et al. (2007)

(Continúa)

Tabla 2. Experimentos de la respuesta intrínseca a la luz en células aisladas e *in situ* (Continuación)

Objetivo	Modelo de estudio	Método para medir la iLR	Detección de ARNm	Antagonistas del sistema fosfoinosítido y/o proteínas G	Bloqueantes de TRPC y agentes quelantes de Ca <sup>2+</sup>	Detección por inmunofluorescencia	Resultados	Autores
Investigar si el iris de los mamíferos es intrínsecamente fotosensible y si los PLR son locales	Retina de líneas de mutantes dobles de ratón (TRPC6 <sup>-/-</sup> TRPC7 <sup>+/+</sup> )	Perforated patch clamp	OPN4 (iris y retina)	N/A	N/A	Melanopsina	Los TRPC3, 6 o 7 como canales homoméricos no están implicados en la iLR. Los TRPC6 y 7 pueden estar involucrados en la iLR como canales heteroméricos	Sekaran, et al. (2007)

ARN mensajero, U73122: 1-[6-((17 $\beta$ -3-metoxistestra-1,3,5(10)-trieno-17-il)amino)hexil]-1H-pirrol-2,5-diona; BAPTA-AM [1,2-Bis(2-aminoetoxo)etano-N,N,N',N'-ácido tetra-acético (acetoximil éster)]; GTPGS: guanosina 5'-O-(3-trifluorofosfato); GDPBS: guanosina 5'-O-(2-iodofosfato); BAPTA: 1,2-bis(2-aminoetoxo)etano- N,N,N',N'-ácido tetra-acético; SK&F 96365: 1-[2-(4-metoxifenil)-2-[3-(4-metoxifenil)propoxi]etil]imidazol; 1-[ $\beta$ -(3-(4-metoxifenil)propoxi)-4-metoxifenil]imidazol; GPAn-2a: pGlu-Gln-D-Trp-Met-NH<sub>2</sub>.

para inhibir la PLC, la proteína cinasa C (PKC) y la presencia de un agente quelante de Ca<sup>2+</sup>, la dispersión de melanosomas con estímulos de luz fue eliminada. Además, los niveles de IP<sub>3</sub> aumentaron más del 100% en respuesta a la luz, en comparación con los controles en oscuridad. Los datos fueron la primera evidencia contundente de la participación del sistema de fosfoinosítidos en la iLR por melanopsina en células nativas, y se dejó abierta la posibilidad de su existencia en las ipRGC de la retina<sup>51</sup>.

El primer estudio realizado con ipRGC aisladas de vertebrado no mamífero y mantenidas en cultivo lo realizaron Contín, et al. en 2006, quienes utilizaron cultivos primarios de células ganglionares obtenidas de embriones de pollo por inmunopaneo con un anticuerpo contra Thy1 para medir el efecto de la luz en la síntesis de melatonina. Demostraron que es un proceso dependiente de la estimulación luminosa y que conlleva la liberación de Ca<sup>2+</sup> de almacenes intracelulares. En estos cultivos pudo detectarse la expresión de los ARNm de la proteína G<sub>q</sub> de la melanopsina y de genes que se expresan en fotorreceptores rabdoméricos (*Pax6* y *Brn3*)<sup>52</sup>. Así se obtuvo la primera evidencia en neuronas retinianas de que las células con melanopsina expresan las enzimas de la vía de transducción G<sub>q</sub>/PLC.

Más tarde, el mismo grupo<sup>53</sup> demostró la participación del ciclo fosfoinosítido (PIP) en el mecanismo de fototraducción. Mediante la evaluación de la actividad de distintas enzimas (DAGK, PIK y PIPK) implicadas en la regeneración del PIP<sub>2</sub>, observaron que las ipRGC activan el ciclo del PIP en respuesta a la luz. Describieron también la participación de la PLC, incrementos en los niveles de IP<sub>3</sub> y la movilización de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub><sup>53</sup>.

Hartwick, et al. (2007)<sup>33</sup> también aplicaron la técnica de inmunopaneo, usando alternativamente un anticuerpo contra melanopsina y anticuerpos dirigidos contra la proteína Thy1, para obtener cultivos enriquecidos de ipRGC de rata, en donde buscaron la fuente del incremento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en la iLR. Los autores propusieron tres posibilidades: TRPC, retículo endoplasmico y VGCC. Cuando se estimularon las ipRGC en presencia de diversos compuestos antagonistas de los TRPC, entre ellos el ácido flufenámico (Tabla 2), se observó que se abatía el incremento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, lo cual daba evidencia de la participación de los TRPC en el mecanismo de fototraducción. Los investigadores incluso pudieron detectar los ARNm de TRPC3, 6 y 7; de forma relevante encontraron que el TRPC7 se expresaba más en las células inmunopaneadas con el anticuerpo antimelanopsina que en las inmunopaneadas con el anticuerpo anti-Thy1. Para confirmar si el

flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  provenía de los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  o de los VGCC, utilizaron un medio nominalmente sin  $\text{Ca}^{2+}$ , bajo el cual se eliminaron las respuestas. En las ipRGC tratadas con tapsigargina persistió la iLR, con lo que se descartó la participación de los almacenes del retículo endoplásmico. El dato contrasta con los resultados de Kumbalasiri, et al.<sup>46</sup>, quienes obtuvieron evidencia de la participación de estos almacenes en células transfectadas. Finalmente, en estas ipRGC aisladas, Hartwick, et al.<sup>33</sup> demostraron que el 90% del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en la iLR se debía a la activación secuencial de los canales activados por voltaje (*voltage gated channels* [VGC]) de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En otro estudio realizado en ipRGC aisladas de retina de rata, Graham, et al. (2008)<sup>54</sup> encontraron que estas células utilizan la cascada de señalización del sistema de los fosfoinosítidos semejante a la cascada rabdomérica de las opsinas de los invertebrados. Mediante el registro de las corrientes iónicas en células completas o en sus fracciones membranales, encontraron que, en respuesta a la luz, las ipRGC activaban la  $\text{G}_{\alpha 11}$ , y ésta posteriormente, la PLC $\beta$ 4. Además, confirmaron por retrotranscripción y por inmunofluorescencia la presencia de dichas proteínas. En registros electrofisiológicos se encontró que la corriente en la iLR persistía bajo tratamiento con antagonistas del receptor IP<sub>3</sub>, o con tapsigargina, e incluso pudo registrarse en fragmentos de membrana de las ipRGC (*inside out y outside out patch clamp*). El tratamiento con wortmanina, un fármaco que inhibe la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, fue el único que disminuyó la magnitud de la corriente, con lo que los autores concluyeron que todas las moléculas implicadas en el mecanismo de fototraducción están insertadas en la membrana plasmática, o se asocian fuertemente a ésta<sup>54</sup>.

### **Estudios de fototraducción en preparaciones de retina**

Los sistemas de expresión heteróloga aportan indicios sobre la interacción de las moléculas en la fototraducción por melanopsina; los trabajos en ipRGC aisladas corroboran y extienden los hallazgos hacia sistemas nativos, pero el registro de las ipRGC *in situ* proporciona los datos en el entorno dentro del cual actúan estos fotorreceptores, ponderando el mecanismo de fototraducción incluso bajo la interacción con otros tipos celulares.

Berson, et al. iniciaron el estudio de las ipRGC en la retina y lograron establecer la naturaleza de estas células como fotorreceptores, al demostrar el cambio de voltaje y la corriente membranal subyacente a la iLR, pero ahondaron poco en el mecanismo de fototraduc-

ción de la melanopsina. Esta clase de experimentos está limitada en gran medida por la dificultad de distinguir el bajo número de ipRGC entre la población de células ganglionares, dado que aquellas no tienen características morfológicas distintivas. Algunos investigadores han recurrido a la cría de ratones transgénicos en los que el promotor del OPN4 se fusiona con la región codificante del gen de una proteína fluorescente. Una estrategia más refinada ha sido utilizar la recombinasa elemento de respuesta a la combinasa (CRE) para inducir la expresión precisa de esas construcciones génicas. En cualquiera de los casos, las ipRGC cuentan con una copia menos de melanopsina, cuyo efecto no es posible evaluar aun en comparación con células de animales silvestres. En algunos casos, se encuentra la expresión de las proteínas reporteras en células en las que no es posible detectar melanopsina por inmunohistología, lo que debería cuestionar si en realidad están registrándose células ipRGC<sup>32</sup>.

La alternativa al uso de animales transgénicos es el marcaje de las ipRGC por inyección y transporte retrógrado desde los NSQ, con grandes limitantes técnicas y de accesibilidad a un número significativo de células, pero sin duda es todavía el método más seguro para registrar inequívocamente ipRGC. Los datos que se discuten a continuación provienen de trabajos en los que se adoptaron uno u otro métodos.

En el año 2006, Warren, et al.<sup>55</sup> investigaron qué moléculas y qué tipo de canales iónicos podrían estar involucrados en el mecanismo de fototraducción de las ipRGC de la retina de las ratas. Consideraron dos tipos de canales como candidatos: los CNG y los TRP. Con la utilización de marcaje retrógrado, registro *whole cell patch clamp* e inmunohistoquímica lograron demostrar que la iLR de las ipRGC *in situ* depende de proteínas G, pero no son la  $\text{G}_t$  (Tabla 2). Los inhibidores específicos de los canales CNG no afectaron a la corriente activada por la luz. Además, en el análisis inmunohistoquímico esos canales no se localizaron en las RGC, ni en las que expresan melanopsina. Con respecto a los TRPC, al utilizar inhibidores específicos (Tabla 2) para éstos, observaron que se inhibió parcial o totalmente la corriente activada por la luz, lo cual respalda la hipótesis de que dicha respuesta en las ipRGC está mediada por los TRPC. Los experimentos inmunocitoquímicos revelaron la presencia del TRPC6 en las células ganglionares, incluidas las ipRGC. Así, los autores concluyeron por primera vez que las ipRGC *in situ* responden a la luz por un proceso dependiente de proteínas G y que el TRPC6 puede ser el canal iónico que provoca la respuesta celular<sup>56</sup>.

En ratones carentes de conos y bastones funcionales, con la técnica de imagen de calcio, Sekaran, et al.<sup>56</sup> midieron la iLR en las ipRGC y evaluaron el efecto de diversos fármacos (Tabla 2). El 2-aminoetoxidi-fenilborato (2-APB), reportado previamente como antagonista del TRPC7, resultó ser el más efectivo en la inhibición de la iLR. El efecto inhibitorio del 2-APB en las células ganglionares fotosensibles se probó *in vivo* midiendo los PLR, y al observar una atenuación significativa en éste, se corroboró la acción del fármaco sobre las ipRGC. Además de aumentar la evidencia de los TRPC como la vía de conductancia de la corriente activada por la luz, los autores fueron pioneros al manipular la actividad de las ipRGC y obtener un efecto conductual<sup>55</sup>.

Como en otros campos de la neurociencia, las cepas de ratones mutantes carentes de un gen han sido muy utilizadas para definir el mecanismo de fototransducción de la melanopsina. Perez-Leighton, et al. trabajaron con ratones carentes de los canales TRPC3, 6 y 7 para determinar la vía de la corriente activada por la luz en las ipRGC (Tabla 2). Mediante registro múltiple con electrodos extracelulares (MAE) y *whole cell patch clamp*, midieron en la retina la iLR. En los registros por MAE encontraron que las ipRGC de todas las cepas mutantes en etapa perinatal (P6-8) mantenían su respuesta de manera similar al tipo silvestre. En los registros electrofisiológicos de mutantes adultos (edades P22-P50), de las cepas TRPC3<sup>-/-</sup> y TRPC7<sup>-/-</sup> se han encontrado respuestas similares a los animales silvestres, pero se detectó la atenuación de la iLR en los mutantes TRPC6<sup>-/-</sup>. Como explicación a sus resultados, estos investigadores concluyeron que ambos tipos, TRPC6 y TRPC7, podían ser el efecto final en la vía de señalización mediada por la melanopsina, pero formando canales heteroméricos<sup>57</sup>. En ese mismo año (2011), el grupo de Yau llegó a conclusiones similares<sup>58</sup> al usar mutantes dobles TRPC6/7<sup>-/-</sup>, con una contribución adicional: encontraron que en el iris también hay células con melanopsina, que funcionan como fotorreceptores responsables del PLR, y que en esta especie (el ratón y quizás los roedores en general) el PLR no requiere la proyección al encéfalo; pero la iLR en el iris no está mediada por ninguno de los TRP descritos hasta la fecha. Además, este grupo proveyó evidencia contundente de que la PLC $\beta$ 4 es efectora de la iLR, pero la identidad de la proteína G no pudo ser determinada.

Un trabajo más reciente sugiere que los canales de potencial transitorio tipo M (TRPM1) también pueden participar en la fototransducción por melanopsina en las

ipRGC<sup>59</sup>. Hughes, et al. demostraron que los ratones mutantes carentes de este canal no presentan el PLR. Por expresión de la  $\beta$ -galactosidasa bajo el promotor TRPM1, estos investigadores demostraron que el canal se expresa en las células ganglionares con melanopsina.

Hasta ahora, la evidencia sugiere que el efecto final en la fototransducción por melanopsina es un canal de la superfamilia TRP, que, dependiendo del subtipo de ipRGC, puede ser un complejo homo o heteromérico, incluso compuesto de diferentes subclases de estos canales (Fig. 2).

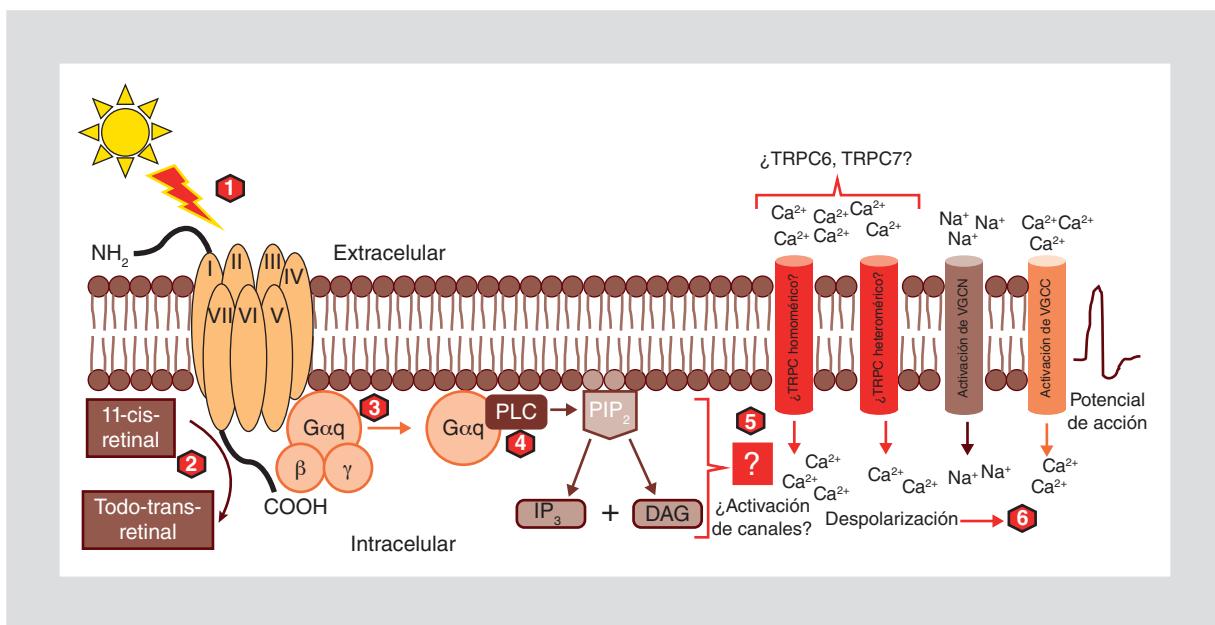
### Implicaciones terapéuticas del OPN4

Las ipRGC de la retina de los mamíferos proyectan directamente a los NSQ, el sitio anatómico del sincronizador biológico. Se estableció ya su exclusividad en la composición del tracto retinohipotalámico<sup>31</sup>, por lo que son la aferencia tanto de la fototransducción de los conos y bastones como de la iLR de la melanopsina; de esta manera, aun cuando la fototransducción de los conos y bastones y la de melanopsina son complementarias para la fotosincronización de los NSQ, únicamente las ipRGC conducen el impulso nervioso necesario para dicha regulación. Es comprensible entonces que un gran número de investigaciones se haya enfocado hacia la relación de la melanopsina y de las ipRGC en los trastornos conductuales del ritmo circadiano.

Diversos estudios conductuales en ratones transgénicos han demostrado que la fototransducción por melanopsina es necesaria para la fotosincronización del ritmo circadiano y para la inducción del sueño por la estimulación lumínosa<sup>19</sup>.

Las ipRGC también conducen el impulso nervioso responsable de las alteraciones conductuales inducidas por la exposición a la luz. En ratones carentes de estas células, el grupo de Hattar<sup>18</sup> demostró, en un modelo de inducción de estados depresivos y de alteración del aprendizaje por exposición a la luz, que se pierden los efectos de ésta al carecer de la transmisión por las células ipRGC.

En los humanos ya se ha demostrado la participación de la melanopsina en distintos trastornos conductuales; por ejemplo, se ha encontrado que la mutación puntual P10L, que puede interferir en la distribución correcta de la melanopsina sobre la membrana plasmática, se presenta solamente en pacientes con síndrome depresivo estacional<sup>61</sup>, un padecimiento en el cual se experimentan estados depresivos en otoño e invierno, cuando los días son más cortos.



**Figura 1.** Mecanismo de fototraducción en las ipRGC. 1: un fotón incide sobre la melanopsina, que es un fotopigmento de la superfamilia de GPCR. 2: el cromóforo 11-cis-retinal se isomeriza a todo-trans-retinal. 3: la proteína G asociada a melanopsina es una  $G_q$ . 4: la estimulación de ésta activa la PLC, que a su vez hidroliza  $PIP_2$  y se producen DAG y  $IP_3$ . 5: se ha propuesto que este sistema lleva a la activación de un canal TRPC 6, TRPC 7 o ambos, que son los efectores finales del mecanismo y provocan la despolarización de la célula. 6: la despolarización se amplifica por los canales sensibles a voltaje de  $Na^+$  y de  $Ca^{2+}$  generando un potencial de acción. En el texto se discuten las evidencias para este mecanismo.  $NH_2$  y  $COOH$ : indican los extremos amino y carboxilo de la melanopsina, respectivamente.

Los experimentos de psicofísica en humanos han concluido que la luz en el intervalo de longitud de onda que estimula a las ipRGC (480-490 nm) tiene la influencia más benéfica en la función cognoscitiva, sobre los estados de ánimo, en la sincronización por los cambios de husos horarios y en el alivio de la migraña y otros padecimientos relacionados con la estimulación luminosa<sup>62,63</sup>.

Se han iniciado investigaciones conducentes al desarrollo de moléculas que alteren selectivamente la fototraducción por melanopsina, sin afectar la de conos y bastones. Jones, et al. identificaron un conjunto de compuestos sulfonamidas, análogos moleculares del retinol, que inhiben la fotoactivación de la melanopsina sin afectar a la fototraducción de los conos ni de los bastones. Con la aplicación de estas moléculas en ratones, sometidos a ensayos de fotofobia, se logró inhibir la respuesta mediada por melanopsina. Así, se abre la posibilidad de manipular farmacológicamente la función de la melanopsina con el fin de tratar trastornos que producen fotofobia en humanos, como la migraña<sup>64</sup>.

## Conclusiones

Es evidente que las ipRGC tienen un rol preponderante en las respuestas fisiológicas extravisuales, es

dicho, en las respuestas a la luz como factor ambiental que condiciona actividades endocrinas, conductuales y anímicas de los organismos; entonces, comprender cabalmente el proceso de fototraducción por melanopsina ha rebasado el interés de la neurobiología celular para entrar en los terrenos de la terapéutica y, en general, del aprovechamiento de la energía luminosa en todos los aspectos de la vida moderna.

## Agradecimientos

Financiamiento por:

- PIFI 2007-2008, 2909 5001-004-09.
- CONACyT Ciencia Básica 2008-01, proyecto 390, fondo 1204, clave 106298.
- PROMEP apoyo a nuevos profesores tiempo completo (PTC), 2009 UACJ-PTC-185.
- PROMEP apoyo a cuerpos académicos.

Agradecemos a Magdalena Aldape Castro su ayuda para preparar la figura 1.

## Bibliografía

1. Kolb H. How the retina works. Amer Sci. 2003;91:28-35.
2. Wässle H. Parallel processing in the mammalian retina. Nat Rev Neurosci. 2004;5:1-11.
3. Provencio I, Warthen D. Melanopsin, the photopigment of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal. 2012;1:228-37.

4. Berson D, Dunn F, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002;295:1070-3.
5. Esquiva G, Lax P, Cuenca N. Impairment of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells Associated With Late Stages of Retinal Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:4605-18.
6. Bellingham J, Foster RG. Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Res*. 2002;309:57-71.
7. Koyanagi M, Takao K, Tsukamoto H, Ohtsu K, Tokunaga F, Terakita A. Jellyfish vision starts with cAMP signaling mediated by opsin-Gs cascade. *PNAS*. 2008;105:15576-80.
8. Scott K, Becker A, Sun Y, Hardy R, Zuker C. Gqα protein function in vivo: genetic dissection of its role in photoreceptor cell physiology. *Neuron*. 1995;15:919-27.
9. Yau K-W, Hardie RC. Phototransduction Motifs and Variations. *Cell*. 2009;139:246-64.
10. Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:340-5.
11. Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:340-5.
12. Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*. 2000;20(2):600-5.
13. Hankins MW, Peirson SN, Foster RG. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci*. 2008;31:27-36.
14. Panda S, Sato TK, Castrucci AM, et al. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science*. 2002;298:2213-6.
15. Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, et al. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci*. 2001;21:6405-12.
16. Thapan K, Arendt J, Skene DJ. An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J Physiol*. 2001;535:261-7.
17. Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, Yau K-W. Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science*. 2003;299:245-7.
18. Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, et al. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature*. 2003;424:76-81.
19. Panda S, Provencio I, Tu DC, et al. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*. 2003;301:525-7.
20. Gamlin PD, McDougal DH, Pokorny J, Smith VC, Yau K-W, Dacey DM. Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Vision Res*. 2007;47:946-54.
21. Lupi D, Oster H, Thompson S, Foster RG. The acute light-induction of sleep is mediated by OPN4-based photoreception. *Nat Neurosci*. 2008;11:1068-73.
22. Yau K-W, Hardie RC. Phototransduction motifs and variations. *Cell*. 2009;139:246-64.
23. Rollag MD, Berson DM, Provencio I. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms*. 2003;18:227-34.
24. Pickard GE, Sollars PJ. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Sci China Life Sci*. 2010;53:58-67.
25. Bellingham J, Foster RG. Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Res*. 2002;309:57-71.
26. Lucas RJ, Peirson SN, Berson DM, et al. Measuring and using light in the melanopsin age. *Trends Neurosci*. 2014;37:1-9.
27. Arendt D. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol*. 2003;47:563-71.
28. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 2000;289:739-45.
29. Putney JW, Tomita T. Phospholipase C signaling and calcium influx. *Adv Biol Regul*. 2012;52:152-64.
30. Wang T, Montell C. Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflugers Arch*. 2007;454:821-47.
31. Lucas RJ. Mammalian inner retinal photoreception. *Curr Biol*. 2013;23:R125-33.
32. Schmidt TM, Chen S-K, Hattar S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci*. 2011;34:572-80.
33. Hartwick AT, Bramley JR, Yu J, et al. Light-evoked calcium responses of isolated melanopsin-expressing retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 2007;27:13468-80.
34. Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*. 2003;55:591-6.
35. Vennekens R, Voets T, Bindels R, Droogmans G, Nilius B. Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium*. 2002;31:253-64.
36. Montell C. TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J Physiol*. 2005;567:45-51.
37. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. 2005;38:233-52.
38. Ambudkar IS. Ca<sup>2+</sup> signaling microdomains: platforms for the assembly and regulation of TRPC channels. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27:25-32.
39. Ambudkar IS, Ong HL. Organization and function of TRPC channelosomes. *Pflugers Arch*. 2007;455:187-200.
40. Birnbaumer L. The TRPC Class of ion channels: A critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:395-426.
41. Bernaudat F, Frelet-Barrand A, Pochon N, et al. Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host. *PLoS one*. 2011;6:e29191.
42. Newman LA, Walker MT, Brown RL, Cronin TW, Robinson PR. Melanopsin forms a functional short-wavelength photopigment. *Biochemistry*. 2003;42:12734-8.
43. Weng K, Lu CC, Daggett LP, et al. Functional coupling of a human retinal metabotropic glutamate receptor (hmGluR6) to bovine rod transducin and rat Go in an *in vitro* reconstitution system. *J Biol Chem*. 1997;272:33100-4.
44. Melyan Z, Tarttelin EE, Bellingham J, Lucas RJ, Hankins MW. Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature*. 2005;433:741-5.
45. Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB, Jegla T. Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science*. 2005;307:600-4.
46. Qiu X, Kumbalasiri T, Carlson SM, et al. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature*. 2005;433:745-9.
47. Kumbalasiri T, Rollag MD, Isoldi MC, Castrucci AM, Provencio I. Melanopsin triggers the release of internal calcium stores in response to light. *Photochem Photobiol*. 2007;83(2):273-9.
48. Bailes H, Lucas R. Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to blue light ( $\lambda_{max} \approx 479$  nm) supporting activation of Gq/11 and G $\beta$  signalling cascades. *Proc R Soc B*. 2013;280:1-9.
49. Koyanagi M, Terakita A. Gq-coupled rhodopsin subfamily composed of invertebrate visual pigment and melanopsin. *Photochem Photobiol*. 2008;84:1024-30.
50. Wong SF. G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. *Neurosignals*. 2003;12:1-12.
51. Isoldi MC, Rollag MD, Castrucci AM, Provencio I. Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:1217-21.
52. Contin MA, Verra DM, Guido ME. An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells. *FASEB J*. 2006;20:2648-50.
53. Contin MA, Verra DM, Salvador G, Ilincheta M, Giusto NM, Guido ME. Light activation of the phosphoinositide cycle in intrinsically photosensitive chicken retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:5491-8.
54. Graham DM, Wong KY, Shapiro P, Frederick C, Pattabiraman K, Berson DM. Melanopsin ganglion cells use a membrane-associated rhabdomeric phototransduction cascade. *J Neurophysiol*. 2008;99:2522-32.
55. Sekaran S, Lall GS, Ralphs KL, et al. 2-Aminoethoxydiphenylborane is an acute inhibitor of directly photosensitive retinal ganglion cell activity *in vitro* and *in vivo*. *J Neurosci*. 2007;27:3981-6.
56. Warren EJ, Allen CN, Brown RL, Robinson DW. The light-activated signaling pathway in SCN-projecting rat retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci*. 2006;23:2477-87.
57. Perez-Leighton CE, Schmidt TM, Abramowitz J, Birnbaumer L, Kofuji P. Intrinsic phototransduction persists in melanopsin-expressing ganglion cells lacking diacylglycerol-sensitive TRPC subunits. *Eur J Neurosci*. 2011;33:856-67.
58. Xue T, Do M, Riccio A, et al. Melanopsin signalling in mammalian iris and retina. *Nature*. 2011;479:67-73.
59. Hughes S, Pothecary CA, Jagannath A, Foster RG, Hankins MW, Peirson SN. Profound defects in pupillary responses to light in TRPM-channel null mice: a role for TRPM channels in non-image-forming photoreception. *Eur J Neurosci*. 2012;35:34-43.
60. LeGates TA, Altunus CM, Wang H, et al. Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature*. 2012;491:594-8.
61. Roecklein KA, Rohan KJ, Duncan WC, et al. A missense variant (P10L) of the melanopsin (Opn4) gene is associated with Seasonal Affective Disorder. *J Affect Disord*. 2009;114:279-85.
62. Dijk D-J, Archer SN. Light, sleep, and circadian rhythms: together again. *PLoS Biol*. 2009;7:e1000145.
63. Holzman DC. What's in a color? The unique human health effects of blue light. *Environ Health Perspec*. 2010;118:A22.
64. Jones KA, Hatori M, Mure LS BJ, et al. Small-molecule antagonists of melanopsin-mediated phototransduction. *Nat Chem Biol*. 2013;9:630-5.