

RECIBO DE LIBRO 62
2003/03/10 N. 39
21
2 eje



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de
Posgrado del Colegio de Ciencias y
Humanidades

CARACTERIZACION DE LA UNION DE GLICINA - 3H Y ESTRICHNINA - 3H A LAS MEMBRANAS SINAPTOSOMALES DE LA RETINA DE LA RANA

T E S I S

Que Para Obtener el Grado de :
Maestro en Investigación
Biomédica Básica

P R E S E N T A E L :
Biólogo Jorge Alberto Pérez León

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se realizó en el laboratorio y bajo la dirección de la Dra. Rocío Salceda Sacanelles, del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco la asesoría de la Dra. Ana María López-Colomé y de la Dra. Marietta Tuena Sangri, del IFC, que participaron de manera muy entusiasta y determinante en el diseño experimental y la interpretación de los resultados de esta tesis.

Este manuscrito fue revisado por los Dres:

Edmundo Chávez-Cossio (Instituto Nacional de Cardiología)

Mauricio Díaz-Muñoz (IFC)

Ricardo Tapia-Ibargüengoytia (IFC)

Alejandro Zentella-Dehesa (IFC)

cuyas opiniones y sugerencias enriquecieron la calidad del trabajo final.

Agradecimientos:

Al Maestro en Investigación Biomédica Básica Alejandro Sosa Peinado por su asesoría en el manejo del programa computacional Inplot.4.

Al personal de la Unidad de Cómputo Académico del IFC por su ayuda durante la impresión de este trabajo.

Durante el curso de Programa de Maestría en Investigación Biomédica Básica y la preparación de la tesis, Jorge Alberto Pérez León fue becario de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA, UNAM) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

INDICE

Resumen.....	1
La glicina como neurotransmisor en el sistema nervioso central	
I.- Introducción.....	2
II.- Síntesis y metabolismo de glicina.....	4
III.- Localización de glicina en el sistema nervioso.....	6
IV.- Sistemas de transporte de glicina.....	7
V.- Liberación de glicina.....	9
VI.- Acciones electrofisiológicas.....	9
VII.- El receptor de glicina (RGly).....	14
VIIa.- Regulación del RGly.....	24
VIIb.- Regulación por esteroides.....	27
La glicina y su interacción con los aminoácidos excitadores	
La Retina.....	36
I.- La fototransducción.....	39
II.- La comunicación neuronal en la retina.....	42
El papel de la glicina dentro de la comunicación neuronal en la retina	
I.- Eventos electrofisiológicos.....	51
II.- Concentración de glicina libre en la retina.....	61
III.- Acumulación y liberación de glicina por la retina.....	61
Objetivos.....	71
Material y Método.....	73
Resultados.....	78
Discusión.....	85
Referencias.....	109
Lista de abreviaturas.....	122

RESUMEN

La glicina funciona como neurotransmisor en el sistema nervioso de los vertebrados, incluyendo la retina. Su acción típica se ejerce cuando se une al receptor postsináptico de glicina (RGly), que es un canal de Cl^- que puede ser bloqueado de manera específica por el alcaloide estriquina; aunque la glicina se une también al receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA), dentro del cual es co-agonista. El sitio de glicina en este receptor es completamente insensible a la estriquina, por lo que la glicina puede activar distintas conductancias, con perfiles farmacológicos diferentes.

En la retina de los mamíferos la glicina participa como transmisor en la capa plexiforme interna (CPI), donde están las sinapsis de las células ganglionares con las interneuronas retinianas. En el resto de los vertebrados la glicina es transmisor en la CPI y en la capa plexiforme externa (CPE), donde se encuentran las sinapsis de los fotorreceptores con las primeras interneuronas. Sin embargo, se carece del conocimiento detallado de los receptores membranales de la glicina en este tejido.

Se realizó una comparación de la unión de glicina radiactiva y de estriquina radioactiva en las membranas de la fracción sinaptosomal de la CPE (P1) y de la CPI (P2) de la retina de la rana. La unión de glicina a las membranas de P1 presentó un sólo sitio de alta afinidad (K_D 12 nM), lo mismo que en las membranas de P2 (K_D 82 nM); la glicina no pudo ser desplazada por estriquina en ninguna de las fracciones membranales, pero la unión pudo ser inhibida por los aminoácidos β -alanina, L-serina, D-serina y el fármaco HA966. Este perfil farmacológico es una mezcla entre la el RGly típico y del sitio asociado al receptor de NMDA.

La unión de estriquina radioactiva presentó dos sitios de alta afinidad en las membranas de cada una de las fracciones sinaptosomales. En P1 éstos tuvieron una K_D de 3.1 y 18 nM, en P2 las afinidades correspondientes fueron de 0.4 y 48 nM. La existencia de 2 sitios de unión de alta afinidad para estriquina es un dato novedoso. El desplazamiento de estriquina radioactiva sólo pudo ser logrado por su análogo estructural $2NH_2$ -estriquina en las membranas de P1 y de P2, y por el esteroide RU5135 en las membranas de P2; ninguna de las moléculas que desplazaron a la glicina pudo inhibir la unión de estriquina, ni siquiera la glicina misma, lo que indica que la estriquina se une a una proteína diferente al RGly o a una forma atípica de éste.

El estudio de los genes de las subunidades del RGly ha revelado que existen isoformas que son insensibles a la estriquina, de modo que es probable que existan algunas que sean tan afines por el antagonista, que el agonista no pueda desplazarlo, como hemos encontrado.

Los datos demuestran la existencia de receptores membranales de glicina, con una farmacología que indica que co-existen el RGly típico y otros sitios de unión. Asimismo, en las membranas de las fracciones sinaptosomales de la retina de la rana hay más de un sitio de unión de estriquina, y su farmacología no corresponde con la del RGly típico. Se discuten estos resultados en el marco de la comunicación neuronal en la retina de la rana.

LA GLICINA COMO TRANSMISOR EN EL SISTEMA NERVIOSO

I.-Introducción

El papel transmisor de la glicina en el sistema nervioso central de los vertebrados está bien establecido. A la fecha, junto con la acetilcolina (Ac) y los aminoácidos glutámico (Glu) y γ -amino butírico (GABA), constituye el paradigma de los ligandos que abren canales iónicos y que provocan cambios en los potenciales de la membrana sináptica. Al igual que con las moléculas mencionadas, la experimentación que llevó al establecimiento de la glicina como neurotransmisor requirió la convergencia de técnicas histológicas, bioquímicas y fisiológicas. Este sincretismo fue tan exitoso que la acción de la glicina sobre las membranas excitables se encuentra caracterizada al detalle en cuanto a los eventos iónicos que provoca, la farmacología de su actividad, el receptor postsináptico que media su acción y la interacción que guarda con otros neurotransmisores.

Las primeras investigaciones dirigidas *ex profeso* a evaluar la función de la glicina como transmisor fueron emprendidas por el grupo de M. H. Aprison, en los Estados Unidos. Este grupo, con el uso de la médula espinal del gato como preparación experimental, demostró que la glicina se encuentra en muy elevadas cantidades en la materia gris dorsal y ventral de este tejido, así como que sus niveles se reducen por la muerte selectiva de las interneuronas espinales (Davidoff *et al*, 1967).

Más tarde, el mismo grupo de Aprison demostró que la aplicación iontóforética de la glicina sobre las motoneuronas espinales tiene los mismos efectos que la estimulación

de las interneuronas presinápticas *in situ*, o sea, la hiperpolarización de las primeras (Werman *et al*, 1967).

Estos dos tipos de resultados experimentales sugirieron que la glicina era el transmisor natural de las interneuronas espinales. Werman y Aprison (1968) postularon que la demostración de un compuesto como transmisor requiere la reunión de los datos que comprendan tres aspectos: neuroquímico (localización y metabolismo), neurofisiológico (reproducción de los efectos electrofisiológicos del transmisor natural en la membrana sináptica) y neuroquímico-fisiológico (liberación de la pre-sinapsis debido a la estimulación). El grupo realizó una serie de trabajos con el objeto de demostrar que la glicina era el transmisor utilizado por las interneuronas espinales en la médula del gato, rigiéndose por el criterio delineado arriba y apoyándose en evidencia ulterior, como los datos neurofarmacológicos (inhibición específica de los efectos sinápticos por drogas determinadas) y neuroanatómicos (autorradiografía) (Aprison, 1990).

A partir de estos trabajos, la investigación sobre la transmisión glicinérgica fue impulsada hasta desembocar en una línea que ha producido uno de los arquetipos en la interacción ligando-receptor en la neurotransmisión. En los apartados siguientes se describirán las evidencias que se han reunido al respecto y posteriormente como se ha investigado el papel de la glicina como neurotransmisor en la comunicación celular dentro de la retina de los vertebrados.

II.- Síntesis y metabolismo de glicina

La glicina es el aminoácido más simple. Su carga neta a pH fisiológico es 0. Se sintetiza directamente a partir de la serina o a partir del hidroxipiruvato. En el cerebro ambos precursores son metabolitos de la glucólisis, por lo que la glucosa es la fuente primaria de glicina en este órgano y aparentemente en el resto del sistema nervioso central (SNC) (Marc, 1985). Con respecto a la síntesis de glicina que se destina a fines de transmisión, la vía de la serina parece ser la responsable de mantener altos los niveles de glicina. La enzima involucrada es la serina-hidroximetil-transferasa (SHMT), que hidroliza el grupo metilo de la serina y produce glicina (fig. 1a). La SHMT requiere como co-factores al fosfato de piridoxal, al ácido tetrahidrofólico y al ión Mn^{2+} . Aun cuando la glicina es parte de rutas metabólicas comunes a muchas células, la concentración de la SHMT está correlacionada con los niveles elevados de glicina en las neuronas propuestas como glicinérgicas, con un enriquecimiento de 20 veces sobre tejidos no neurales (Marc, 1985; Aprison, 1990).

También se ha propuesto que el glioxalato pudiera ser precursor directo de la glicina dentro del SNC, ya que la transaminación irreversible de éste produce glicina y se ha demostrado en preparaciones de tejido nervioso *in vitro* (fig. 2) (Daly, 1990). No obstante, no se ha identificado un precursor del glioxalato en este tejido, además de que las concentraciones altas de esta molécula resultan inhibitorias de la cadena respiratoria. De la misma manera, algunos grupos han argüido que la treonina puede ser un precursor de glicina, pues la inyección sérica de treonina eleva los niveles de glicina en diversas áreas del SNC. Pero el dato no ha sido reproducido consistentemente y, por otra parte,

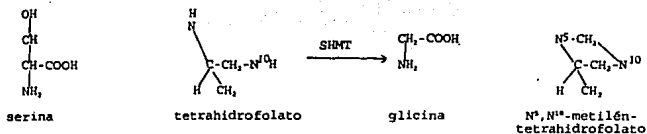
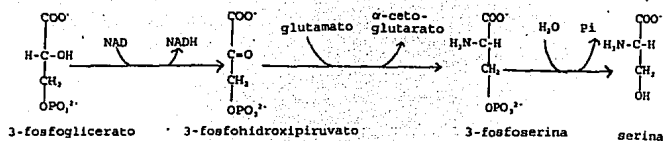


Figura 1a.- La síntesis y degradación de la glicina se lleva a cabo por la serina-hidroxi-metil-transferasa (SHMT). Tomado de Salceda, 1983.

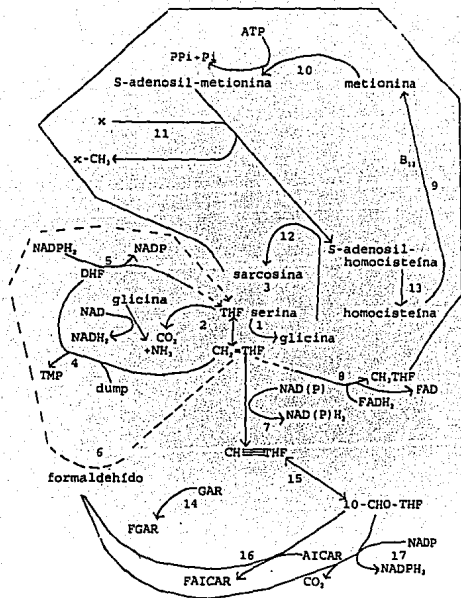


Figura 1b.- Metabolismo de la glicina y su relación con las unidades de un carbono, conforme ha sido propuesto por Daly (1990). Abreviaturas: THF: tetrahidrofolato; DHF: dihidrofolato; CH₂-THF: N⁵,N¹⁰- metilén-THF; CH THF: N⁵,N¹⁰- metenil- THF; dUMP: ácido desoxiurídico; GAR: glicinamida ribosil- 5- fosfato; FGAR: formil-GAR; AICAR: aminoimidazol-carboxamida ribosil- 5- fosfato; FAICAR: amidoimidazol carboxamida ribosil- 5- fosfato. Enzimas: 1) SHMT; 2) SDG; 3) deshidrogenasa de la sarcosina; 4) sintetasa del timidilato; 5) DHF reductasa; 6) via no enzimática; 7) CH₂-THF deshidronagenasa; 8) CH₂-THF reductasa; 9) CH₂-THF: transmetilasa de la homocisteína; 10) metionina- adenosín transferasa; 11) reacciones varias de transmetilación; 12) glicina N- metiltransferasa; 13) adenosil-homocisteinasa; 14) GAR- formil metiltransferasa; 15) CH THF ciclohidrolasa; 16) AICAR formil metiltransferasa; 17) 10-CHO-THF deshidrogenasa. Tomado de Daly, 1990.

no hay evidencia de actividad enzimática "treonina-aldolasa" en región alguna del SNC (fig. 2) (Daly, 1990).

Como ya se ha dicho, la SHMT correlaciona de una manera positiva con la concentración de glicina en las diversas regiones del SNC en que se han medido. Aun cuando en el hígado existen 2 isoformas de la enzima, una citoplásmica y otra mitocondrial, en el SNC sólo se ha detectado esta última (Daly, 1990), lo que tiene consecuencias importantes debido a la interrelación entre la glicina y los metabolitos derivados del folato, como se explicará más adelante.

En la figura 1b se muestra que la glicina se cataboliza mediante tres rutas metabólicas: por la acción de la D-aminoácido oxidasa, por un sistema general de descarboxilación muy activo en el telencéfalo y en el cerebelo y por la actividad reversible de la SHMT (Salceda, 1983). Esta última actividad reversible consume metilén-tetrahydrofolato (metilénTHF) y produce tetrahydrofolato (THF), y se ha propuesto que podría constituir un tipo de gluconeogénesis por el SNC, aunque es más fuerte la idea de que se utiliza para canalizar derivados del folato, potencialmente tóxicos. El metilénTHF producido en la síntesis de glicina (fig. 1b) se equilibra rápidamente con el formaldehído, cuyos niveles altos resultan tóxicos. Ya que la SHMT consume el metilénTHF durante la degradación de glicina, se ha propuesto que una poza potencialmente tóxica del metilénTHF limitaría la actividad de la SHMT en la dirección de la síntesis de glicina (Daly, 1990).

Además, existe un sistema catabólico de glicina, inicialmente caracterizado en el hígado, que es el más importante para la degradación de glicina en el SNC (figs. 1b y

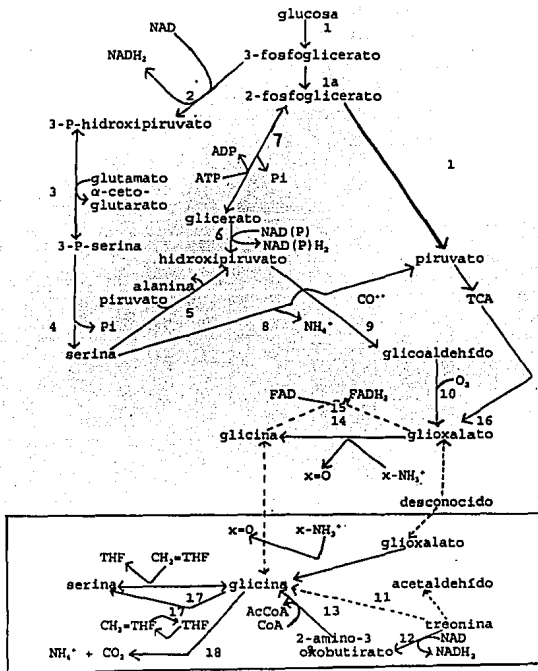


Figura 2.- Vías del metabolismo de glicina en una panorámica general del metabolismo. Abreviaturas: THF= tetrahidrofolato; CH₂-THF, N⁵,N¹⁰-metilénTHF; CoA, coenzima A; AcCoA, acetil CoA; x-NH₂, donador aminoácido transaminasa; x=O, aceptor de α-cetoácido transaminasa; Pi, fosfato inorgánico. Enzimas: 1, la vía glicolítica; 1a, fosfogliceromutasa; 2, D-3- fosfoglicerato deshidrogenasa; 3, 3-fosfoserina:2 oxoglutarato aminotransferasa; 4, 3-3-fosfoserinafosfatasa; 5, L-serina:piruvato aminotransferasa; 6, D-glicerato deshidrogenasa; 7, D-glicerato cinasa; 8, L-serina deshidratasa; 9, hidroxipiruvato descarboxilasa; 10, glicolato oxidasa; 11, treonina aldolasa; 12, treonina deshidrogenasa; 13, 2- amino -3- oxobutirato CoA ligasa; 14, glicina transaminasa (aminoácido: glicoxalato aminotransferasa); 15, D-aminoácido oxidasa; 16, isocitrato liasa; 17, SHMT; 18, el SDG aceptado a la SHMT. Dentro del cuadro se representa los procesos intramitocondriales. Tomado de Daly, 1990.

2). El sistema está formado por un complejo de 4 cadenas polipeptídicas, localizadas en la membrana interna de la mitocondria. Se denomina de forma genérica sistema degradativo de glicina (SDG) (Daly, 1990). El SDG es muy específico para la glicina, cataliza la descarboxilación del aminoácido, con la producción de amonio, CO_2 y de metilénTHF a partir del carbono α . El sistema requiere NAD, fosfato de piridoxal y tetrahidrofolato como co-factores, está acoplado con la SHMT, de modo que el metilénTHF liberado se utiliza por ésta para sintetizar serina, con el consumo de una segunda molécula de glicina. Así que la acción conjunta de ambos sistemas enzimáticos da cuenta de la degradación de la glicina, a la vez que canaliza los metabolitos del folato (Daly, 1990).

III.- Localización de glicina en el SNC

Los niveles de glicina se midieron inicialmente en la médula espinal del gato, en la regiones lumbares y sacras, mediante cromatografía de intercambio iónico y ensayos colorimétricos del tejido aislado (Aprison, 1990). La concentración más alta se encontró en la materia gris ventral (7.1 $\mu\text{mol}/\text{g}$ de tejido), con un orden descendente de concentración: gris dorsal > blanca ventral > blanca dorsal (Davidoff *et al*, 1967). Las determinaciones posteriores del contenido de glicina, dentro de las mismas regiones, han arrojado valores de 34.6 $\mu\text{mol}/\text{g}$ (perro), 65 $\mu\text{mol}/\text{g}$ (rata) y 2.85 $\mu\text{mol}/\text{g}$ (hombre) (Daly, 1990).

El contenido de glicina se ha determinado en un gran número de especies, que

representan a todas las clases de vertebrados; sin embargo, las concentraciones más altas se encuentran siempre en la región cervical y lumbar de la médula espinal y, de forma intrasegmental, en la materia gris ventral y dorsal (Daly, 1990), excepto en los animales que carecen de extremidades, como las serpientes. Esta distribución coincide con el propuesto papel de la glicina como neurotransmisor inhibitorio de las interneuronas involucradas en la coordinación del movimiento de las extremidades (Aprison, 1990; Daly, 1990).

La corteza cerebral de los anfibios y los reptiles no sigue este patrón de distribución de glicina endógena, puesto que en dichos tejidos la concentración del aminoácido es tan alta como en los segmentos medulares (3.4 $\mu\text{mol/g}$) (Daly, 1990; Müller y Snyder, 1978). Un caso semejante se encuentra en la retina de todos los vertebrados, con concentraciones tan altas como 7 $\mu\text{mol/g}$ (Marc, 1985; Voaden, 1976); lo que fue un indicio para considerar a la glicina como neurotransmisor en otras regiones del SNC, además de la médula espinal.

IV.- Sistemas de transporte de glicina

Los sistemas de transporte de alta afinidad de glicina, dentro de la médula espinal, se describieron desde 1969 (Neal y Pickles) en la rata. Más tarde, Johnston e Iversen

(1971) y Logan y Snyder (1972), lograron distinguir un sistema de alta afinidad -constante de afinidad (K_m)= 26 μM - de otro de baja afinidad - K_m = 923 μM - en la fracción libre de núcleos de la médula espinal de la rata; además de que describieron la inhibición del sistema de alta afinidad por la carencia de Na^+ .

También en homogenados de la médula espinal de la rata, Aprison y McBride (1974) demostraron la inhibición del sistema de alta afinidad por la disipación de los gradientes de Na^+ y de protones.

Con respecto a otro mecanismo de transporte de glicina, se sabe que la proporción del contenido de glicina entre el líquido cefalorraquídeo y el suero es la más baja que la de cualquiera de las moléculas para las que se haya calculado (Aprison, 1990). Una explicación a este hecho es el transporte de glicina, desde el líquido cefalorraquídeo hacia el suero, que demostraron Murray y Cutler (1970) y Dutzinski y Cutler (1974).

Los sistemas de alta afinidad de transporte de glicina, dependientes del ión Na^+ , se han descrito en la médula espinal, en el cerebro y en el *tectum* óptico de la rana (Davidoff y Adair, 1976; Müller y Snyder, 1978) y en la retina de todas las clases de vertebrados (Marc, 1985). La alta estereoespecificidad de estos sistemas se ha demostrado por la nula inhibición que experimentan en presencia de concentraciones milimolares de serina, alanina y β -alanina (Chin y Lam, 1980; Marc, 1985; Salceda, 1989).

V.- Liberación de Glicina

La liberación de glicina- ^{14}C de la médula espinal en perfusión se reportó por Jordan y Webster (1967) con la rata como animal experimental. Aprison y sus colaboradores (1970a y b) también reportaron la liberación de glicina- ^{14}C , pero de la médula espinal del sapo por estimulación de las astas dorsales. Mulder y Snyder (1974) encontraron que la estimulación por concentraciones altas de K^+ produjo la liberación de glicina de las rebanadas de la médula espinal de la rata, pero no de la corteza cerebral.

En sinaptosomas, Osborne y sus colaboradores demostraron la liberación de glicina mediante la aplicación de estímulos eléctricos (1973). Las concentraciones despolarizantes de K^+ también producen la liberación de glicina de los sinaptosomas de la retina del pollo (López-Colomé *et al*, 1978) y de la rana (Salceda, 1989).

La dependencia de Ca^{++} en el proceso de liberación se ha demostrado en las anteriores preparaciones; no obstante, existen reportes de la liberación de glicina, provocada por estímulos despolarizantes, en medios carentes de Ca^{++} (Marc, 1985; Smiley y Basinger, 1990).

VI.- Acciones electrofisiológicas

Los trabajos clásicos sobre la acción de la glicina en las neuronas se realizaron por el grupo de Aprison (Werman *et al*, 1967). En éstos, la aplicación iontoforética de la

glicina sobre las motoneuronas espinales del gato produjo la hiperpolarización de la membrana y un aumento en su conductancia. Al mismo tiempo, las espigas antidrómicas de las motoneuronas fueron inhibidas por la glicina, en correlación con la dosis administrada, como también se encontró que el tamaño de los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSP's) se redujo con la administración de glicina, lo que sugirió que la hiperpolarización producida por el aminoácido involucraba mecanismos iónicos semejantes al IPSP. Esto quedó confirmado por los experimentos en los cuales la reversión del IPSP se obtuvo por la inyección intracelular de iones Br^- y I^- , al igual que la hiperpolarización provocada por la glicina (Werman *et al*, 1967). Toda esta evidencia fisiológica sugirió que la glicina era el transmisor natural en la médula del gato.

En este punto es importante aclarar que, desde las primeras caracterizaciones acerca de la transmisión sináptica en la médula, se encontró que la estricnina antagonizaba los efectos hiperpolarizantes del transmisor natural, así como los de la glicina aplicada extracelularmente (Aprison, 1990). Este hecho indicó que la interacción de la glicina como agonista y de la estricnina como antagonista, concurría sobre la misma proteína; es decir, sobre el receptor postsináptico de la glicina (RGly). Así que gran parte de la caracterización del RGly se realizó con el uso de la estricnina como el ligando más específico de este receptor post-sináptico.

La hiperpolarización de las membranas neuronales se produce por corrientes de cationes hacia fuera de la membrana, o de aniones hacia el interior de ésta. En el caso del receptor de glicina, la corriente es acarreada por iones de Cl^- , que permean hacia el

interior de la neurona luego de que la glicina se ha unido a su receptor. El poro que abre la glicina es permeable no sólo al Cl^- sino también a varios aniones pequeños, como el Br^- , I^- , F^- , SCN^- , HCOO^- y CH_3COO^- .

En estudios del RGly en los que se midió la corriente acarreada por diversos iones y el potencial de inversión de ésta, calculado por la ecuación de Hodgkin-Goldman-Katz, se definió un orden de permeabilidad: $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ (Bormann, 1990). También se ha determinado el siguiente orden de conductancia: $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^- > \text{F}^-$. El que estas secuencias estén invertidas entre sí, significa que los iones permeantes se unen a sitios determinados dentro del canal que forma el receptor, o sea, que los iones no se mueven en un medio acuoso al atravesar el canal (Bormann, 1990).

Por estudios realizados con la técnica de parche de membrana (del inglés "patch-clamp") en neuronas cultivadas de la raíz dorsal del ganglio de la rata (DRG), se determinó el valor de la conductancia principal del receptor de glicina en 46 picoSiemens, con varios subestados en el intervalo de 12 a 46 picoSiemens (Bormann, 1990).

Los estudios de Bormann y colaboradores (1987) en las neuronas DRG, con el uso del "outside-out patch clamp", en condiciones de variación de la relación molar SCN/Cl , demostraron que la conductancia no disminuía monotónicamente al aumentar dicha relación molar, lo que significa que dentro del canal existe más de un sitio de unión, por el cual compiten los aniones.

Las corrientes activadas por glicina, como las que se provocan por otros transmisores, decaen conforme los receptores postsinápticos experimentan el proceso de desensibilización. La aplicación de la glicina, a una concentración de $20 \mu\text{M}$ a las

neuronas DRG en cultivo provoca una corriente máxima que se desensibiliza en dos etapas, con sendas constantes de tiempo de 2 y 20 segundos. Esto quiere decir que en el canal del RGly pasa por varios estados abiertos y varios estados cerrados, lo cual concuerda con los diversos subestados de conductancia (Bormann, 1990).

Sackmann y sus colaboradores (1982, 1983) han demostrado que la corriente al pico, registrada en fijación de voltaje -"voltage-clamp"- aumenta proporcionalmente con el cuadrado de la concentración de glicina administrada, lo que fue interpretado como que la apertura del canal requiere de la unión secuencial de 2 moléculas del agonista (Bormann, 1990).

Tokutomi y sus colaboradores (1989), fueron los primeros en registrar las corrientes provocadas por glicina en neuronas aisladas del telencéfalo. En este estudio se demostró que las respuestas electrofisiológicas provocadas por la glicina pudieron ser reproducidas por L-serina, L-alanina, D-alanina, β -alanina y taurina, pero no por GABA. Por otra parte, los mismos aminoácidos que provocaron respuestas electrofisiológicas fueron capaces de desensibilizar de manera cruzada al receptor. Con estos datos y con el análisis de la estructura de los aminoácidos utilizados, se propuso que la unión de la glicina a su receptor involucra la interacción, en dos sitios diferentes, de los grupos NH_2 y COO^- del agonista en una conformación plegada, y la unión del agonista, por puentes de hidrógeno, a un tercer sitio dentro del RGly, que impone restricciones alostéricas y tiene una localización asimétrica dentro del receptor (Tokutomi *et al*, 1989).

Más tarde, Takahashi y Momiyama (1991) demostraron que las características del canal abierto por la glicina, registradas en rebanadas de la médula espinal de la rata,

eran las mismas a las registradas en neuronas en cultivo y en neuronas aisladas, en cuanto a varios estados de conductancia y a la cinética de apertura y de cierre. Además, mediante el registro de las corrientes de membrana en el soma y en las dendritas, concluyeron que las características del canal asociado al receptor de glicina son indistinguibles entre los sitios sinápticos y extrasinápticos, todo lo cual sugirió que las propiedades electrofisiológicas, descritas hasta entonces en preparaciones de neuronas aisladas, parecían reproducirse *in situ*.

VII.- El Receptor de Glicina

Pese a que los datos electrofisiológicos han servido de base para idear la estructura del RGly, su caracterización completa ha requerido de la convergencia de varias técnicas. Por un lado, con este receptor se desarrolló uno de los ensayos clásicos del uso de radioligandos radioactivos. Por otra parte, el RGly fue de los primeros receptores a aminoácidos neurotransmisores que logró ser aislado y analizado en cuanto a composición de subunidades proteicas. Esto último, finalmente, ha desembocado en el conocimiento detallado de las proteínas que forman al RGly y de los genes que las codifican. Para estos fines, el alcaloide estriquina, extraído de la planta hindú *Strychnos nux-vomica*, ha sido una herramienta muy importante.

En 1973, Young y Snyder utilizaron estriquina-³H para medir su unión a las membranas de sinaptosomas aislados de la médula espinal y de la médula oblongada de la rata. La unión de estriquina-³H resultó saturable y de alta afinidad, dos características que la asociaron con una proteína de membrana. Pero lo más importante fue la evidencia de que la unión de estriquina-³H resultó desplazable por la glicina, así como por la β-alanina y la taurina, dos aminoácidos similares en potencia a la glicina para provocar depresión de la actividad de las motoneuronas espinales. Estos datos indicaron que la unión de la estriquina-³H se estaba efectuando sobre el receptor postsináptico de la glicina.

Young y Snyder profundizaron sobre las interacciones de la estriquina-³H y el

receptor postsináptico de la glicina. Puesto que el desplazamiento de estircina-³H requería la participación de dos moléculas de glicina por molécula del ligando radioactivo, se dedujo que la interacción de las moléculas ocurría por efectos alostéricos sobre la misma proteína (Young y Snyder, 1974a). También demostraron que los detergentes Tritón X-100 y el desoxicolato, al solubilizar el receptor de la membrana, disminuyeron drásticamente la unión de estircina-³H.

Posteriormente, los mismos autores demostraron el desplazamiento de estircina-³H por Cl⁻ y por una serie de iones halógenos (Br⁻, I⁻, F⁻) y orgánicos pequeños (SCN⁻, HCOO⁻, CH₃COO⁻) con una potencia y eficacia muy similares a las que mostraban para invertir el IPSP cuando se inyectaban a las motoneuronas espinales (Young y Snyder, 1974b).

Todo esta evidencia resultó muy favorable para la consideración de la estircina como el ligando más específico y aún por el receptor postsináptico de la glicina, de manera que pronto fue la única molécula radiactiva utilizada para caracterizar a éste (lo que sin duda tuvo consecuencias muy importantes para perder de vista otro de los aspectos que, como molécula neuroactiva, desempeña la glicina).

El uso de la unión específica de la estircina-³H se extendió al sistema nervioso central de la rata, donde se encontró que coincidieron los sitios de transporte de alta afinidad de glicina-³H y de unión de estircina-³H (Müller y Snyder, 1978). La estircina-³H también se utilizó para caracterizar al receptor de glicina en la retina de los bovinos (Borbe *et al*, 1981) y de la rata (Schaeffer y Anderson, 1980). En cada caso, la farmacología de la unión específica de estircina-³H correspondió a un orden de potencia

en desplazamiento glicina> β -alanina> taurina, lo que pasó a considerarse otra de las características diagnósticas del receptor postsináptico de glicina.

Con la disponibilidad de la estriquina como el ligando más afín por el RGly (K_D de alrededor 4-8 nM), se tuvo la oportunidad de usar al alcaloide para la purificación de esta proteína. El primer paso fue dado por Pfeiffer y Betz, quienes en 1981 solubilizaron con Tritón X-100 el receptor de glicina a partir de homogenados de la médula espinal de la rata. Los resultados fueron extendidos al unir covalentemente la estriquina- 3H al receptor solubilizado, lo que marcó una banda de 48 kDa en geles de poliacrilamida-SDS (Graham *et al*, 1981). A partir del receptor solubilizado, Pfeiffer y sus colaboradores (1982) aislaron al receptor de glicina mediante el uso del análogo de estriquina, 2-amino-estriquina, en columnas de afinidad. Este trabajo abrió brecha en cuanto al análisis de la composición polipeptídica del receptor, puesto que en geles de poliacrilamida-SDS reportaron por vez primera la existencia de tres bandas, de 48, 58 y 93 kDa, como las constituyentes del receptor purificado. En el mismo trabajo se reportó la masa total del receptor en 246 kDa (Pfeiffer *et al*, 1982).

El receptor purificado fue utilizado para generar anticuerpos monoclonales, de entre los cuales los más sobresalientes serían los denominados GlyR 4a y GlyR 7a, que reconocen a la subunidad de 48 kDa (4a y 7a) y de 93 kDa (7a) (Pfeiffer *et al*, 1984). Este reconocimiento cruzado implicaba que los diferentes polipéptidos del receptor eran homólogos entre sí.

Posteriormente se descubrió que el receptor de glicina, aislado y purificado de la

médula espinal del cerdo, compartía la composición polipeptídica y la reactividad inmunológica con el RGly de la rata (Graham *et al*, 1985). A partir de esta preparación y con el uso de lectinas, se demostró que las subunidades de 48 y 58 kDa son proteínas que experimentan glicosilación, pero no así la de 93 kDa. Este dato y la localización del antígeno reconocido por el anticuerpo 7a siempre sobre la cara citoplásmica de la membrana (Triller *et al*, 1985; Altschuler *et al*, 1986), establecieron las bases para considerar a la proteína de 93 kDa como periférica; mientras que a las de 48 y 58 kDa como integrales.

La topografía del receptor de glicina terminó por moldearse con el uso de reactivos de entrecruzamiento de proteínas, con los cuales se obtuvo el hetero-dímero de 48 y 58 kDa, excluido siempre el polipéptido de 93 kDa (Langosch *et al*, 1988). Ya que la proteína de 48 kDa siempre fue la más abundante en estas preparaciones, de acuerdo con la masa total del receptor, se propuso un modelo en el cual el receptor de glicina se constituye por un pentámero de tres subunidades de 48 y dos de 58 kDa; con la asociación periférica, sobre la cara citoplásmica de la membrana, de la de 93 kDa (figura 3) (Langosch *et al*, 1990).

Los estudios de marcaje covalente de la subunidad de 48 kDa con estricnina-³H demostraron que el marcaje podía prevenirse con glicina (Graham *et al*, 1981), lo que indicó que esta subunidad incluye el sitio de unión del antagonista y el del agonista. Por esta razón y dado que se disponía entonces del receptor purificado, la subunidad de 48 kDa fue la primera del receptor de glicina que se sometió al análisis a nivel de los ácidos

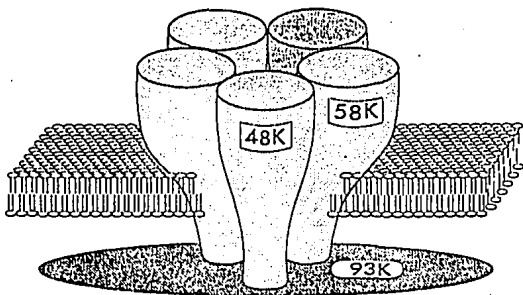
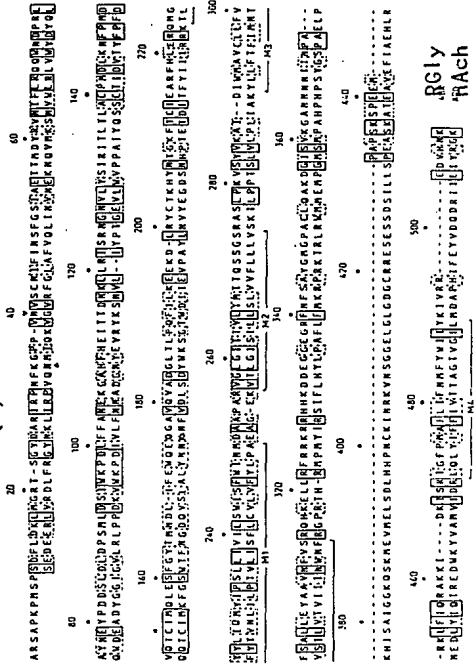


Figura 3.- Esquema de la estructura oligomérica del complejo canal iónico-receptor de glicina (RGly), conforme se ha propuesto por Langosch y colaboradores (1990). Los sitios de reconocimiento del agonista y del antagonista se localizan sobre las subunidades de 48 kDa, mientras que se supone que la de 93 kDa sirve como ancla al complejo con el citoesqueleto; los detalles se discuten en el texto (tomado de Langosch y colaboradores, 1990).

nucleicos. Grenningloh y colaboradores (1987), utilizaron los fragmentos hidrolizados del péptido de 48 kDa, para sintetizar oligonucleótidos a partir de su secuencia de aminoácidos, con los cuales revisaron las bibliotecas genómicas del sistema nervioso central de la rata. Con esta estrategia aislaron y clonaron el gen que codifica la subunidad de 48 kDa (a partir de entonces denominada α), del RGly de la médula de la rata. Del marco de lectura de este gene se dedujo una proteína con 421 residuos de aminoácidos, con la secuencia amino-terminal extracelular y un sitio de glicosilación en el residuo 38. El perfil de hidropatía de la proteína reveló cuatro segmentos transmembranales, entre los aminoácidos 220-246, 253-270, 285-308 y 393-410 (secuencialmente, M_1 - M_4); de los cuales se propuso que los segmentos M_1 - M_3 podrían formar el canal de Cl^- del complejo.

La comparación de este gen, así como de la proteína deducida, con el receptor de acetilcolina, demostró identidad en el 21% de los aminoácidos y propiedades químicas similares (cambios conservativos) en otro 22%. Las semejanzas entre ambas proteínas continuó al encontrarse que los segmentos extracelulares comparten un par de cisteínas en las posiciones 140 y 154; de tal manera que pueden tender entre ellas un puente disulfuro y así, formar un asa que -se piensa- permite la unión del ligando (Grenningloh *et al*, 1987). Un reporte simultáneo sobre el receptor de GABA permitió deducir que las subunidades de los tres receptores mencionados son homólogos, y se obtuvo el primer indicio para considerar la existencia de una familia de receptores acoplados a canales iónicos. Se presenta un esquema de la subunidad α del receptor de glicina en la figura 3a.

(i)



(ii)

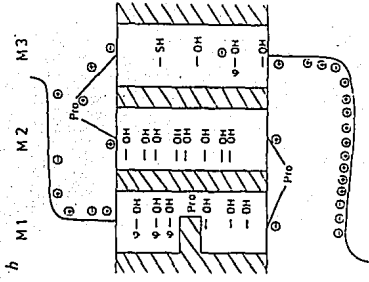


Figura 3a.- Secuencia de aminoácidos (i) y estructura esquemática de la subunidad α del Rgly (ii). Los aminoácidos se simbolizan por el código de una letra; las secuencias subrayadas (M_1 - M_2) corresponden a las regiones transmembranales probables. Se muestra también la secuencia de la subunidad α del receptor de acetilcolina, para comparar: los a.a. encerrados en líneas continuas son idénticos, en líneas discontinuas las sustituciones conservativas. Los triángulos son los sitios susceptibles de glicosilación; los * las Cys conservadas. En (ii) se señala la posición de residuos de Tyr (ψ -OH), Ser ó Thr (-OH) y Cys (-SH). Los residuos de a.a. que se piensa participan en los sitios de unión del anión se señalan por las cargas respectivas. Tomado de Grenningloh et al., 1987.

La inyección del ARN mensajero de ciertas células hacia los ovocitos de la rana *Xenopus* es un método exitoso para el análisis de receptores de transmisores. Esta técnica permite que los ovocitos expresen las proteínas, con lo cual pueden analizarse aun cuando no se conozca la estructura del gen que las codifica. Con esta estrategia, Akagi y Miledi (1988) registraron las corrientes iónicas del RGly, expresado a partir del ARN aislado de la médula de la rata, con características electrofisiológicas y farmacológicas diversas, que sugirieron la existencia de diversos tipos del RGly. La diversidad de los receptores de glicina, que se sugirió por este trabajo, se confirmó al encontrarse diversas variantes de la subunidad α del RGly, existentes tanto en la rata como en el humano (Grenningloh *et al*, 1990).

Puesto que los sitios de unión de agonistas y antagonista del receptor de glicina se localizaron dentro de la subunidad α (Graham *et al*, 1981), y dado que la inyección al ovocito del gen que codifica esta subunidad fue suficiente para generar receptores con características farmacológicas y electrofisiológicas similares a las registradas *in situ* (Schmieden *et al*, 1989), se pensó que además de formar los sitios de unión de ligandos, la subunidad α constituía el canal de Cl^- del complejo. Sin embargo, Grenningloh y colaboradores (1990b), quienes aislaron y clonaron el gen que codifica a la subunidad de 58 kDa (denominada β), encontraron que esta proteína, expresada en ovocitos de *Xenopus*, respondió a la unión de glicina con la generación de una corriente de Cl^- , la cual pudo ser antagonizada por estriquina. Esto indicó que, para el receptor *in situ*, se

requiere la participación de ambas subunidades, además de que podrían encontrarse isoformas homogéneas (Betz, 1991).

No obstante que el manejo de los ácidos nucleicos permitió avances espectaculares en la caracterización del RGly y, en general, de todos los receptores, el trabajo con el complejo proteico en sí arrojó datos muy importantes acerca de la activación del receptor. Por ejemplo, Marvizón y colaboradores (1986), en membranas sinaptosomales de la médula de la rata, demostraron que la interacción entre estriquina-glicina es alostérica, como se sugirió previamente (Young y Snyder, 1974a). Por otra parte, introdujeron el uso de otros ligandos, como los derivados de estriquina (2-amino-estriquina, nitro-estriquina, etc.) y los derivados del esteroide 5,6,7,8 tetrahidro -4*H*-isoxazol[4,5 - σ]azepin-3-ol (THAZ), para competir con el sitio de unión de estriquina y de glicina, respectivamente (Marvizón *et al*, 1986). El mismo grupo amplió y fundamentó la idea de 2 sitios diferentes de unión de agonista y antagonista, al demostrar que los aniones de Eccles (Cl⁻, Br⁻, I⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻) regulan negativamente la unión de estriquina y favorecen la unión de glicina (Marvizón *et al*, 1986), y que durante la unión de los antagonistas (estriquina y sus derivados, el esteroide RU5135) se reduce la entalpía del sistema, mientras que cuando se unen los agonistas (glicina, taurina, β -alanina) se aumentan la entropía y la entalpía (Ruiz-Gómez *et al*, 1989a). Esto último significa que la unión de cada tipo de ligando favorece diferentes conformaciones del complejo, lo que explicaría por qué unos abren el canal de Cl⁻ y otros lo cierran.

Por otra parte, en 1989 se reconstituyó el receptor de glicina de la médula espinal

de la rata en liposomas de fosfatidilcolina (García-Calvo *et al*, 1989). El receptor reconstituido fue capaz de responder a la estimulación con glicina generando flujos de Cl⁻, así como de unir estricnina-³H, de manera desplazable por la misma glicina y por los antagonistas 2-amino-estricnina y el RU5135 (García-Calvo *et al*, 1989).

La preparación del RGly reconstituido en vesículas de fosfolípidos sirvió para realizar los primeros intentos de localización de los sitios de unión de glicina y estricnina dentro de la subunidad α . Ruiz-Gómez y colaboradores (1989b) encontraron que el receptor modificado en sus residuos de lisina por el isotiocianato de fluoresceína requirió mayor concentración de glicina para desplazar a la estricnina-³H, aunque la interacción mol:mol de estos ligandos sobre el receptor se mantuvo constante. Más tarde, el mismo grupo demostró que la modificación de los residuos de tirosina redujo el número máximo de sitios de unión de estricnina-³H, sin alterar su afinidad, por proteólisis de la subunidad determinaron la localización de estos residuos en el fragmento 171-220 (Ruiz-Gómez *et al*). Este fragmento es de localización extracelular y equivalente al sitio de unión de los antagonistas en la subunidad α del receptor nicotínico de acetilcolina (Steinbach e Ifune, 1989; Vandenberg *et al*, 1992), sumando así una evidencia más al origen común de ambos receptores.

El análisis genético de las subunidades del receptor de glicina ha tenido un desarrollo sorprendente. Hasta 1990 se habían encontrado 3 variantes de la subunidad α para el RGly de la rata, respectivamente α_1 , α_2 , α_3 , y dos variantes de la subunidad β (Langosch, Betz y Becker, 1990). Las variantes difieren en su localización temporal: α ,

en el adulto, α_2 en los neonatos y la etapa embrionaria y α_3 durante los primeros estadios postnatales; así como en su localización espacial: α_1 en la médula espinal y el tallo cerebral, α_3 en el cerebro anterior y β en el resto del cerebro (Betz, 1991). Aun cuando estas subunidades difieren en su secuencia aminoacídica, todas conservan la alta afinidad por la unión de estriquina- ^3H , el desplazamiento de ésta por glicina y otros agonistas y la generación de corrientes de Cl^- .

Con todo, el hallazgo más sorprendente ha sido el de una variante de la subunidad α_2 que presenta corrientes de Cl^- , activadas por glicina, que no pueden ser antagonizadas por estriquina en dosis menores a $1 \mu\text{M}$, lo que resulta sorprendente si se recuerda la afinidad en el intervalo de nanomolar por el alcaloide en el resto de las subunidades (Kuhse, Schmieden y Betz, 1990). Esta subunidad, la denominada α_2^* , difiere en un sólo aminoácido con respecto a la α_2 , en la posición 167, en que hay un glutámico en lugar de glicina. Lo más importante es que, lejos de ser una quimera, el ARN mensajero de la subunidad α_2^* es el más abundante durante los diez primeros días postnatales en la médula espinal de la rata, y se sugiere que ello explica la insensibilidad a estriquina que presentan los roedores durante los primeros días de vida (Betz, 1991).

Las variantes α_1 y α_2 presentan diferencias en su sensibilidad a los diversos agonistas del receptor de glicina. Mientras que los receptores formados sólo de variantes α_1 responden a la β -alanina y a la taurina al expresarse en ovocitos de *Xenopus*, los receptores con variantes α_2 requieren de concentraciones 30 veces más altas (Schmieden *et al*, 1992). Además, pese a que ambos tipos de variantes responden en el mismo intervalo de concentraciones de glicina, las corrientes generadas son

siempre 3 o más veces mayores en las variantes α_2 que en las α_1 ; lo que señala que pueden conservarse los mismos sitios de reconocimiento, sin que ello implique que la conductividad del canal asociado sea la misma (Schmieden *et al*, 1992).

La expresión del gen de cada una de las variantes α , en la línea celular 293, de riñón de humano, así como la de diversas mutantes puntuales de ésta, ha demostrado que el sitio de unión de estrocinina-³H involucra a los residuos de aminoácidos Gln 160, Tyr 161, Lys 200 y Tyr 202 (Vandenberg *et al*, 1992). Ya que estos residuos se encuentran en una asa extracelular, de acuerdo con la estructura deducida de la subunidad (Grenningloh *et al*, 1987), y puesto que esta región es homóloga en las subunidades α de los receptores GABA_A y nicotínico de acetilcolina, se ha propuesto que la región conserva una estructura terciaria común en los tres receptores (Vandenberg *et al*, 1992).

Schmieden y sus colaboradores han extendido estos resultados al demostrar que los aminoácidos 111 y 212 de la variante α , determinan la sensibilidad a taurina, aun cuando la activación por glicina sea poco eficiente (Schmieden *et al*, 1992).

Todos estos datos concernientes a la subunidad α del R_{Gly} indican que existen variantes que difieren en su localización temporal y espacial, las mismas que presentan diferencias puntuales que les confieren sensibilidad restringida al antagonista. Además, las diferencias puntuales explican, aparentemente, la discriminación entre unos y otros agonistas, fundamentalmente, la mayor conductividad de unas variantes que la de otras.

VII.- Regulación del RGly

Al igual que ocurre con el resto de los receptores a neurotransmisores, la regulación del RGly ha sido poco estudiada. Al respecto, desde las investigaciones pioneras de Young y Snyder (1974a) se sabía que los aumentos en pH disminuyen el coeficiente de Hill (n_H) para el desplazamiento de estricnina- ^3H , mientras que el desvío hacia a la acidez inhiben este desplazamiento. Sin embargo, los detalles al respecto no fueron retomados sino hasta 1986, en que Marvizón y colaboradores reportaron la modulación positiva de la unión de estricnina- ^3H por las sales de sodio de los aniones de Eccles (Marvizón *et al*, 1986). Más tarde, Ruíz-Gómez y colaboradores demostraron que la reducción de los puentes disulfuro aumenta el n_H en el desplazamiento de estricnina- ^3H por glicina; pero ocurre lo contrario al estabilizar éstos por oxidación. Estos datos originaron la idea de que la oxidación-reducción de los grupos sulfhidrilo del receptor pueden modular su función *in situ* (Ruíz-Gómez *et al*, 1991a), lo que fue corroborado más adelante por registros electrofisiológicos de las células ganglionares de la retina (Pan y Lipton, 1993).

Se reconoce que la incorporación covalente de grupos fosfato a ciertas proteínas es un mecanismo de su regulación (Dohlman *et al*, 1991). Al respecto, la fosforilación del RGly fue reportada en 1991. Con el uso de las membranas de la médula espinal de la rata, Ruíz-Gómez y colaboradores (1991b) demostraron la fosforilación de la subunidad α , en el asa intracitoplásmica M_3 - M_4 . La cromatografía en capa fina de los fragmentos del péptido fosforilado señaló a los residuos de serina como los sitios de fosforilación. Se carece de datos que correlacionen esta modificación con diferentes

estados de afinidad o de conductancia del RGly, pero la cinética y la farmacología de la fosforilación indicaron que la proteína-quinasa C (PKC) puede ser la responsable de esta modificación (Rufz-Gómez *et al*, 1991b).

Como parte de la regulación del RGly, la proteína de 93 kDa empieza a ocupar un sitio preponderante. Su participación en la unión del ligando y en la apertura del canal no se han demostrado (Langosch *et al*, 1990), los estudios recientes demostraron que co-purifica con tubulina y que se une a ella con muy alta afinidad ($K_D = 2.5$ nM). Asimismo, el receptor purificado de la médula de la rata puede unirse a tubulina polimerizada (Kirsch *et al*, 1991).

El aislamiento y la clonación del gen de la proteína de 93 kDa de la médula de la rata fue logrado en 1992 (Prior *et al*, 1992). El marco de lectura de este gen predice una proteína con 736 residuos de aminoácidos, con un sitio de unión covalente para ácido mirístico en el extremo amino terminal y tres regiones de hélice α que pueden asociarse a la membrana plasmática.

La proteína de 93 kDa fue renombrada como Gefirina, del vocablo griego que significa puente (Prior *et al*, 1992). El nombre se sugirió a partir de la evidencia de que la proteína se asocia con las del citoesqueleto. El hecho de que los ARN mensajeros derivados del gen se encuentren en el hígado, el pulmón y el riñón -además de en el sistema nervioso central- sugirió que la gefirina pudiera realizar funciones generales de anclaje de las proteínas membranales con el citoesqueleto, más que una función única dentro del complejo del RGly (Prior *et al*, 1992). Por esta última posibilidad, es importante

reconsiderar la evidencia que se ha obtenido respecto a la localización de las sinapsis glicinérgicas, por inmunocitoquímica con el uso del anticuerpo mAb 7a, que reconoce a la gefirina.

Por otra parte, la co-expresión de la gefirina con las diferentes variantes de la subunidad α ha demostrado que la primera determina la afinidad por el ligando. En la línea celular 293, de riñón de humano, la afinidad de los homorreceptores α_2 por la glicina se aumenta en presencia de gefirina, mientras que se reduce la sensibilidad a estricnina (Takagi *et al*, 1992). La co-expresión de homorreceptores de la variante α_3 , o de los heterodímeros α_2 - α_3 , desplegó el mismo fenómeno de regulación, todo lo cual se explicó por la posible interacción de la gefirina con el citoesqueleto (Takagi *et al*, 1992).

Un dato más que sugiere la regulación del RGly por la gefirina es la fosforilación de esta proteína. A diferencia de la participación de la PKC en la fosforilación de la subunidad α (Ruíz-Gómez *et al*, 1991b), Langosch y sus colaboradores (1992) localizaron la fosforilación del RGly en la gefirina, además de que demostraron que dicha modificación no presenta las características farmacológicas de las proteínas-cinasas activadas por nucleótidos cíclicos, ni por la PKC.

VIIb.- Regulación por esteroides

La regulación que pueden efectuar los esteroides sobre los receptores acoplados a canales iónicos se describió primero para el receptor GABA_A (Harrison y Simmonds, 1983). Pronto se encontró un efecto similar para el RGly (Gent y Wacey, 1983), en particular, un aumento en las respuestas electrofisiológicas por el anestésico local clorometiazol, tanto por aplicación iontoforética en el tallo cerebral, como por inyección intraperitoneal en la rata (Gent y Wacey, 1983).

Al respecto, Wu y sus colaboradores (1990) utilizaron neuronas bajo fijación de voltaje para demostrar que la progesterona y sus metabolitos modulan negativamente las corrientes de Cl⁻ abiertas por glicina, al contrario del efecto que provocan las mismas moléculas sobre las corrientes del receptor GABA_A. Los experimentos de competencia por el RGly demostraron que los esteroides se unen a un tercer sitio, diferente de aquellos del agonista y del antagonista (Wu *et al*, 1990).

Este tipo de resultados se extendieron al nervio óptico de la rata, donde se demostró un aumento en la afinidad del RGly por la glicina por efecto de diversos corticosteroides y el clorometiazol (Prince y Simmonds, 1992). En este caso, como en trabajos anteriores (Gent *et al*, 1983; Wu *et al*, 1990), el efecto fue diferencial sobre el RGly con respecto al GABA_A, de modo que los sinergistas de la acción de la glicina modularon negativamente las respuestas provocadas por GABA, pero los esteroides que aumentaron las respuestas a este último no tuvieron efecto sobre las de glicina (Prince y Simmonds, 1992).

LA GLICINA Y SU INTERACCION CON LOS AMINOACIDOS EXCITADORES

Quizá una de las primeras evidencias respecto a la interacción de la glicina con los aminoácidos excitadores (EAA), fue proporcionada con la técnica de unión específica de ligandos radioactivos. Por ejemplo, De Feudis y sus colaboradores (1978) demostraron, por autorradiografía, que los sitios de unión específica de glicina-³H dentro del encéfalo de la rata no corresponden a los de estricnina-³H. Un poco más adelante, Kishimoto *et al* (1981), reportaron la existencia de 2 sistemas de unión de glicina-³H en la médula espinal y en la corteza de la rata, ambos de alta afinidad e insensibles al desplazamiento por estricnina. En este caso, la unión pudo ser inhibida por una serie de α -aminoácidos, entre los cuales destacaron la D-serina y la alanina (Kishimoto *et al*, 1981). Ambos tipos de evidencia se consideraron como situaciones atípicas del RGly, por ser insensibles a estricnina, sin recurrir a la explicación de que la glicina pudiera interactuar con otras proteínas de membrana diferentes al RGly.

Por el contrario, los datos surgidos de la electrofisiología generaron una nueva idea acerca de las funciones neuroactivas de la glicina, como se expone a continuación.

En 1987 Johnson y Ascher utilizaron el cultivo de neuronas corticales de cerebro de ratón para medir en ellas las corrientes iónicas generadas por la aplicación del ácido N-metil-D-aspartato, el agonista arquetípico del receptor tipo NMDA de los aminoácidos excitadores (EAA). Estos investigadores encontraron una correlación directa entre la

magnitud de la respuesta inducida por NMDA y la concentración de glicina en el medio de cultivo. Una respuesta similar se observó con la D-serina, la alanina y la valina.

La glicina potenció el efecto del NMDA a una dosis efectiva de 10 μ M. Los efectos fueron resistentes a la estricnina, lo que indicó que no eran mediados por el receptor postsináptico, típico de la médula espinal.

La interacción entre el NMDA y la glicina sobre el receptor tipo NMDA a EAA, quedó confirmada al demostrarse que el ARN mensajero correspondiente al receptor aislado del cerebro de rata, expresado de manera heteróloga en *Xenopus*, requirió de la aplicación conjunta de ambos aminoácidos para provocar corrientes iónicas (Kleckner y Dingledine, 1988). También mediante la expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus* del receptor aislado del cerebro de rata, se caracterizaron a las quinoxalinas y a las kinureninas como los primeros antagonistas selectivos del sitio de glicina en el complejo canal iónico-receptor NMDA (NMDAr) (Kleckner y Dingledine, 1989). Una evidencia posterior al respecto fue la demostración del antagonismo no competitivo que, sobre las respuestas provocadas por el NMDA, ejerció el ácido 7-cloro-kinurénico (7CK) (Kemp *et al*, 1988); ese antagonismo pudo ser revertido por la aplicación de glicina o D-serina. En este trabajo Kemp y sus colaboradores (1988) demostraron el desplazamiento de la unión específica de glicina³H, de forma competitiva, por el 7CK.

Los ensayos de unión específica arrojaron mayor información respecto a las moléculas que pudieran interactuar con este sitio de glicina y, por lo tanto, de las características del

sitio mismo. Marvizón y sus colaboradores (1989) encontraron que el ácido aminociclopropano-carboxílico (ACPC) inhibió competitivamente la unión de glicina-³H en las membranas sinaptosomales de la médula espinal de la rata, así como que el mismo ACPC aumentó la unión de los inhibidores del canal iónico asociado al receptor, con una E_{CSO} semejante a la glicina. Kessler y sus colaboradores (1989) demostraron, en las membranas sinaptosomales de la corteza cerebral de la rata, que tanto la unión de glicina-³H, como el aumento provocado por glicina en la unión de glutámico-³H y de los inhibidores del canal, se antagonizan por el ácido kinurénico, la D-serina, la D-alanina y diversas quinoxalinas.

Foster y Kemp (1989) lograron inhibir la unión de glicina-³H insensible a estrícina, en las membranas sinaptosomales de la corteza cerebral de la rata, con la 3-amino-1-hidroxipirrolidin-2-ona (HA966), la misma droga que antagonizó las corrientes provocadas por la infusión de NMDA en rebanadas corticales. Hood y sus colaboradores (1989) desplazaron a la glicina-³H con la D-ciclo serina, además de que este aminoácido pudo potenciar las respuestas provocadas por NMDA, aunque no con la misma potencia que la glicina. La reproducción parcial de los efectos de la glicina sobre el complejo NMDAr, que también se reportó para el HA966 (Wood *et al*, 1990a), ha generado el concepto de agonista parcial para designar a ambas drogas. Este contiene la idea de que las drogas reconocen y se unen al sitio de glicina, y al hacerlo provocan la misma clase de efectos que el agonista natural, aunque no con la misma potencia.

El requerimiento de glicina para activar al complejo NMDAr se ha demostrado en la generación de GMP cíclico en las neuronas cerebelares (Wood *et al*, 1990b) y en las

corrientes provocadas por la infusión de NMDA en el tallo cerebral del ratón, *in vivo* (Fletcher *et al*, 1990). Esto, aunado a la estequiometría 1:1 que presentan los sitios de unión de glutámico-³H sensibles a NMDA y de glicina-³H insensibles a estricnina, en las membranas sinaptosomales del cerebro de la rata (Theding *et al*, 1989), ayudó a establecer la idea de que la glicina y el ácido glutámico actúan como co-agonistas en el complejo NMDAr. Finalmente, a la fecha se sabe que el gene expresado de forma heteróloga en ovocitos de *Xenopus* también muestra el requerimiento por glicina, y se sugiere que los sitios de glicina y glutamato se localizan sobre la misma cadena polipeptídica (Moriyoshi *et al*, 1991; Kemp y Leeson, 1993).

Con esta idea, que ha revolucionado el campo de la investigación de los receptores a EAA, se dirigen los estudios actuales para la elucidación de la estructura del sitio de glicina dentro del complejo del NMDAr. Para tal efecto se han sintetizado un gran número de compuestos, principalmente derivados del ácido kinurénico, de las quinoxalinas y del ácido indol-2-carboxílico. Entre los primeros destacan el 7CK (Kleckner y Dingledine, 1989); más recientemente el derivado 5,7-dicloro-kinurénico (5,7DCK; Hurt y Baron, 1991) y los derivados 5,7-dibromo-kinurénico y 5-iodo,7-cloro-kinurénico (Foster *et al*, 1992). En ensayos de unión específica y de registro de respuestas electrofisiológicas, estas moléculas despliegan un antagonismo específico contra el sitio de glicina en el complejo NMDAr.

El efecto de los agonistas del sitio de NMDA y de glicina, sobre la unión específica de los antagonistas de glicina, pudo evaluarse hasta que se sintetizó el 5,7 DCK-³H, el

primer antagonista del sitio de glicina disponible en forma radioactiva (Hurt y Baron, 1991). Actualmente, con el uso de este ligando se sabe que sólo la misma glicina, la D-serina y el 7CK presentan una dosis inhibitoria efectiva en concentraciones nanomolares.

Las quinoxalinas 6-ciano,7-nitro-quinoxalina 2,3-diona (CNQX) y 6,7-dinitro-quinoxalina 2,3-diona (DNQX) son antagonistas en el sitio de glicina, con afinidad en el intervalo de concentraciones micromolares. Sin embargo, estos compuestos también despliegan una actividad antagónica importante en los receptores de EAA de ácido kaínico (KA) y del ácido α -amino -3-hidroxi -5-metilisoxazol -4-propiónico (AMPA), por lo que son menos selectivos que los derivados del ácido kinurénico (Kemp y Leeson, 1993).

Los derivados del ácido indol-2-carboxílico, con sustituciones halógenas en las posiciones 5 y 6, antagonizan la unión de glicina-³H en las membranas sinaptosomales de la corteza cerebral de la rata (Gray *et al*, 1992); así como los incrementos en el GMP cíclico provocados por la aplicación conjunta de NMDA y glicina, o NMDA y D-serina, en el cerebelo de la rata *in vivo* (Rao *et al*, 1993). Estas moléculas son los primeros logros en el intento de síntesis de antagonistas competitivos de fácil acceso al sistema nervioso central, a diferencia de otro tipo de moléculas que interactúan con el sitio de glicina en el complejo NMDAr.

Entre todos los antagonistas sintéticos, existen además las moléculas genéricas 4-amido-2-carboxitetrahydroquinolinas, derivadas del 5,7-DCK, que presentan una afinidad

en el orden de nanomolar para el desplazamiento de glicina-³H y NMDA-³H (Lesson, *et al*, 1992). El grupo de Grimwood sintetizó otro compuesto radiactivo, la +/- 4 amino-(trans)-2-carboxi-5,7-dicloro-4-fenil-aminocarbonilamina, 1,2,3,4-tetrahidroquinolina-³H (L-689,560-³H), que se une específicamente a las membranas de la corteza hipocampal de la rata; unión que se antagoniza por glicina y viceversa (Grimwood *et al*, 1992).

Con base en las propiedades de los antagonistas sintéticos, se delinearon las características de su sitio de unión, o sea, del farmacóforo del antagonista. Se propuso que éste interactúa con los ligandos por fuerzas coulómbicas con los grupos ácidos, y que establece puentes de hidrógeno, como donador con los grupos carbonilo y como aceptor con los grupos NH₂ de los ligandos. Además presenta dos regiones hidrofóbicas: una que restringe, estéricamente, la unión de grupos aromáticos con sustituciones halogenuras y otra más que permite la entrada de los sustituyentes en la posición 4 de los derivados del Kyn (Kemp y Leeson, 1993).

Pese a la diversidad de moléculas que se han sintetizado y estudiado en la interacción con el sitio de glicina, entre cada tipo, agonista o antagonista, hay algunas características comunes en estas moléculas. Por ejemplo, todos los agonistas son α -aminoácidos neutros y pequeños (D-serina, ácido amino-ciclo-propano-carboxílico). Los antagonistas también son de este tipo de moléculas (cicloleucina, ácido amino-ciclo-butano-carboxílico), así como los agonistas parciales (D-cicloserina y HA966). Las moléculas sintéticas antagonistas (los derivados del ácido kinurénico, los del indol-2-carboxílico y las quinoxalinas) tienen en común la presencia de anillos aromáticos, el carecer de un grupo básico fuerte y, por lo tanto, un comportamiento di-ácido (Cordí *et*

al, 1990; Fletcher *et al*, 1990).

Una molécula que no se ha considerado hasta la fecha, pero que se ha demostrado interactúa con la glicina en un sitio diferente del receptor postsináptico de ésta, es la β -alanina, la cual desplazó a la glicina- ^3H en ensayos de unión específica realizados en las membranas de la corteza cerebral del ratón (Saransaari y Oja, 1992). En este reporte, la β -alanina- ^3H resultó desplazada por la glicina, el NMDA y el ácido glutámico, pero no por la estricnina, y de esta manera involucra a la β -alanina en el sitio de glicina del complejo NMDAr, o en algún otro sitio de glicina insensible a estricnina.

Desde que se demostró el aumento en la unión específica de glicina- ^3H por efecto del glutamato en las membranas sinaptosomales del cerebro de la rata (Kessler *et al*, 1989), quedó claro que la interacción entre los sitios de glicina y de NMDA en el NMDAr es recíproca. Los efectos de los ligandos de un sitio sobre la unión de los ligandos al otro sitio se resumió por A. Cordi (1990) de la siguiente manera:

- a) los agonistas del sitio de glicina aumentan la afinidad de los agonistas del NMDA por su sitio;
- b) los antagonistas del sitio de glicina reducen la unión específica de los agonistas de NMDA;
- c) Los antagonistas del sitio de glicina estimulan la unión específica de los antagonistas competitivos del NMDA;
- d) los agonistas del NMDA aumentan la afinidad de los agonistas de glicina;

- e) los antagonistas del sitio de NMDA reducen la afinidad de los agonistas de glicina; y
- f) los agonistas del NMDA reducen la potencia de los antagonistas de glicina.

Por último, es necesario mencionar que la línea de investigación abierta por Johnson y Ascher (1987) ha ananzado desde la noción de la glicina como un modulador del NMDAr, hasta la firme idea de que el glutamato y la glicina son co-agonistas en este complejo canal-iónico\receptor; lo que, finalmente, puede originar una nueva manera de concebir la interacción de los receptores y sus ligandos.

LA RETINA

La retina se encuentra en el fondo del globo ocular de los vertebrados, en el hemisferio denominado copa óptica. El globo ocular presenta varias capas tisulares, la más externa de las cuales es de recubrimiento, que forma en la parte posterior la esclerótica y en la anterior la córnea. La siguiente capa tisular es la coroides, que contiene el tejido vascular que irriga al ojo; la coroides forma el iris en la parte anterior del globo ocular y una abertura circular en éste constituye la pupila. Del iris se encuentra pendiente el cristalino que, por los movimientos musculares del primero, concentra los rayos luminosos que viajan y llegan a la retina.

Bajo la coroides, dentro de la copa óptica, se encuentra el epitelio pigmentario de la retina, de estructura característica, que se separa de la primera por una lámina basal (de Bruch). El epitelio pigmentario de la retina (EPR) se denomina de tal manera por que sus células producen y acumulan melanina y en sí mismo es un tejido de funcionalidad relevante, sobre todo por la actividad fagocítica que presenta periódicamente, renovando los segmentos externos de los fotorreceptores. Además, el EPR forma parte de la barrera hemato-retiniana y, por otro lado, protege de los niveles excesivos de luz incidente sobre la retina.

La siguiente capa hacia el interior del globo ocular es la retina neural. Las neuronas en ella son de varios tipos, *grosso modo* seis, a saber: los fotorreceptores (Ph), las células bipolares (B), las células horizontales (H), las amacrinas (A), las interplexiformes (IP) y las células ganglionares (G).

Estos tipos neuronales guardan un orden laminar estricto: la capa de fotorreceptores, formada por los segmentos externos de éstos; los somas de los fotorreceptores constituyen la capa nuclear externa; los somas de las interneuronas se disponen en la capa nuclear interna y la capa ganglionar contiene a las células G (figura 4).

De la misma manera, las neuronas retinianas extienden sus procesos dendríticos y axonales en dos capas bien definidas: en la capa plexiforme externa (CPE) hacen contacto sináptico los procesos dendríticos de los Ph, las H y las B, en la capa plexiforme interna (CPI) los de las B, A y G. Las IP extienden sus procesos en ambas capas. Finalmente, los axones de las G constituyen el nervio óptico, a través del cual el impulso nervioso generado en la retina se transmite hacia el encéfalo (figura 4).

La estructura de las sinapsis intrarretinianas se ha estudiado con detalle. Las sinapsis entre Ph, H y B se arreglan en elementos de tres, por lo que se conocen como tríadas (Bonting, 1976). En ellas se dispone una B al centro y dos H a los lados (Dowling y Boycott, 1966). La terminal del Ph se invagina de forma característica en las tríadas, formando pedículos o sinapsis planas (Wässle y Boycott, 1991). En los pedículos se forma una estructura característica de la terminal presináptica del Ph: el listón sináptico, que es la disposición, en esa forma, de las vesículas sinápticas (Pasantes-Morales y Morán, 1988), mientras que en las sinapsis planas las membranas pre y postsinápticas aparentan estar sólo adosadas. Se ha propuesto que los circuitos iniciados en sinapsis en listón tienen diferente destino a los que se inician en sinapsis planas (Wässle y Boycott, 1991).

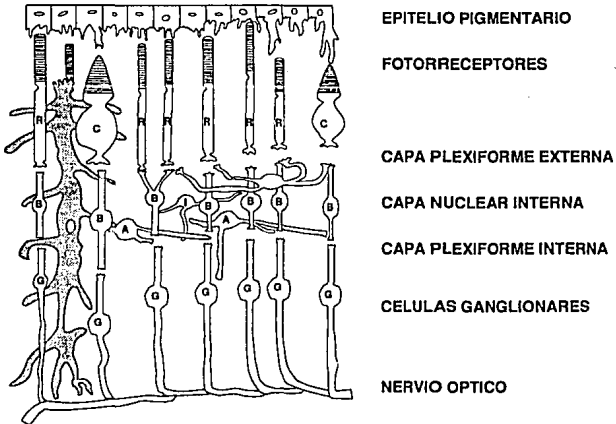
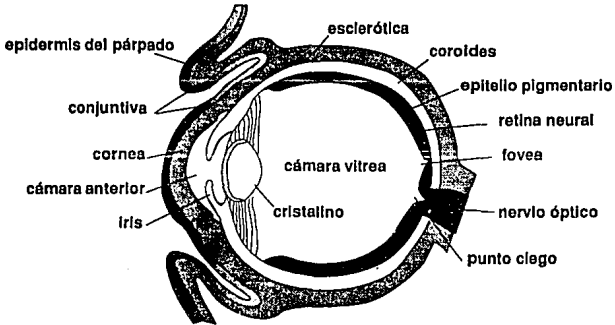


FIGURA 4.- Localización de la retina dentro del globo ocular; b) los tipos neuronales y las capas en que se disponen en la retina de los vertebrados. Fotorreceptores: conos (C) y bastones (R); interneuronas; células bipolares (B), horizontales (H), amacrinas (A), interplexiformes (I) y ganglionares (G). Las capas plexiformes corresponden a las capas de comunicación sináptica. También se muestra una célula de Muller (M), el tipo más prominente de célula glial en la retina (Adler y Farber, 1985).

En la CPE también existen numerosas uniones comunicantes, entre conos y bastones (Sterling *et al*, 1986) y entre las H (Kaneko, 1987). Por otra parte, las sinapsis entre Ph y H son recíprocas y, sobre las H, las células IP hacen contacto sináptico de tipo químico.

Con base en el estudio histológico de la CPI, Famiglietti y Kolb propusieron su delimitación en 5 estratos, denominados ordinalmente en relación próximo distal a la capa de células ganglionares; los estratos del 1 al 3 comprenden la denominada lámina *a* y los estratos 4 y 5 la lámina *b*.

Dentro de la CPI las B terminan directamente sobre las G. En esta capa plexiforme las A presentan sinapsis químicas y uniones comunicantes con las B (Sterling *et al*, 1986); y sinapsis químicas con las G (Wässle y Boycott, 1991).

En la CPI también existe un acoplamiento entre células del mismo tipo, en este caso entre las A, que establecen sinapsis químicas y uniones comunicantes entre sí (Wässle y Boycott, 1991). Las células IP forman sinapsis con las A y las B; en ambos casos pueden ser elementos pre ó postsinápticos (Wässle y Boycott, 1991).

El desarrollo de la retina es motivo de estudio, por que es interesante saber cuales son las determinantes de los diferentes tipos celulares, así como por conocer qué factores son responsables de su organización en capas estrictamente definidas. Sin pretender exponer de manera intensiva estos tópicos, se sabe que el globo ocular se origina de la vesícula óptica, la cual es una evaginación del telencéfalo. La vesícula óptica se diferencia en dos láminas celulares: la interna formará la retina neural y la

externa el EPR. Las células neuroepiteliales que forman la capa distal pasan por numerosos ciclos celulares antes de migrar desde la superficie vítrea hacia la coroidea; cerca de ella experimentan una nueva división y luego salen del ciclo celular. En este momento migran nuevamente, ahora en sentido opuesto y, aparentemente, es en este punto en el que pueden empezar a reconocerse diferentes tipos neuronales. El proceso, aun explicado de manera sucinta, es interesante y ha sido motivo de numerosos estudios, sobre todo por el hecho de que se pueden caracterizar neurotransmisores putativos antes de la sinaptogénesis, y aun de manera previa al establecimiento de las respuestas a la luz (Adler y Farber, 1986; Marc, 1986).

I.- La Fototransducción

Cualquier evento de la biología neuronal es relevante, puesto que finalmente son las neuronas el tipo celular que permite la interacción organismo-ambiente en su grado más fino; sin embargo, la transducción de señales representa un evento singular desde el punto de vista de que es, a final de cuentas, la transformación de un tipo de energía a otro.

La fototransducción se lleva a cabo en los segmentos externos de los Ph. El evento inicial es la absorción de un cuanto de luz por una molécula del pigmento fotosensible, ya sea rodopsina en los bastones, o conopsina en distintos tipos de conos. La rodopsina

es el mejor caracterizado de estos pigmentos.

La rodopsina es una proteína integral de membrana, con siete segmentos transmembranales. El extremo amino de la rodopsina es de localización extracelular y el extremo carboxilo intracelular. Entre los cruces transmembranales 6 y 7 se encuentra inserto el cromóforo 11-cis-retinal, un derivado de la vitamina A. En su cara citoplásmica, la rodopsina se encuentra acoplada a la transducina, que es una proteína G oligomérica, constituida por tres subunidades: α , β y γ . La transducina une al nucleótido difosfato de guanosina (GDP) y durante la fototransducción intercambia a éste por trifosfato de guanosina (GTP).

Al incidir un cuanto de luz sobre el 11-cis-retinal, provoca su isomerización a la forma todo-trans; la isomerización lleva a un cambio conformacional de la rodopsina, que pasa por diversos intermediarios. De entre ellos, la meta-rodopsina II activa a la transducina (Salceda, 1988). Finalmente, la rodopsina se descompone en opsina y 11-trans-retinal, que es reducido hasta retinol.

La activación de la transducina por la rodopsina (R^*), lleva al desensamblaje de sus diferentes subunidades: la subunidad α intercambia GDP por GTP y activa a una fosfodiesterasa (PDE). La fosfodiesterasa activa hidroliza el enlace 3'-5' del monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) y produce GMP. Este evento es crucial en la fototransducción, ya que el canal catiónico que mantiene despolarizado a los fotorreceptores se abre por GMPc.

En la oscuridad, los niveles altos del nucleótido mantienen abierto el canal catiónico, por el que permean Na^+ , Ca^{++} y K^+ (Salceda, 1988). En el segmento interno del

fotorreceptor existe una bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ que consume ATP; el gradiente generado por esta bomba se combina con la corriente del canal catiónico en el segmento externo, así que en el fotorreceptor fluye una corriente constante de Na^+ (la corriente oscura) de fuera hacia dentro en el segmento externo y de dentro hacia fuera en el segmento interno. La corriente oscura mantiene despolarizado al Ph en ausencia de estimulación luminosa (-50 hasta -30 mV).

Este cuadro, tan claro actualmente, requirió de grandes esfuerzos experimentales para ser dilucidado. En 1985, Fesenko y sus colaboradores demostraron que podían inducirse corrientes catiónicas en membranas del segmento externo de Ph, registradas por "patch-clamp", con la aplicación de GMPc al medio de perfusión; de modo que quedó claro que éste era el responsable del funcionamiento del canal (Fesenko *et al*, 1985).

El efecto final de la fototransducción es la hiperpolarización del Ph. Como consecuencia, la liberación tónica de neurotransmisor, que se lleva a cabo en esta célula, se interrumpe; la interrupción constituye el mensaje hacia el resto de las interneuronas retinianas.

La fototransducción es un sistema de muy alta ganancia. En primer término, una molécula de rodopsina puede responder a un cuanto de luz, pero la R^* puede activar a 500 moléculas de transducina (Kaupp y Koch, 1986). Aun cuando la interacción transducina/PDE es 1:1, cada PDE hidroliza más de doscientas moléculas de GMPc, de modo que la señal de un cuanto de luz se amplifica hasta un millón de veces (Kaupp y Koch, 1986). La amplificación es un proceso que se repite posteriormente, en la

transmisión neuronal, donde cada fotorreceptor conecta sobre tres interneuronas primarias; a su vez, las diferentes interneuronas establecen múltiples conexiones entre sí (Sterling *et al*, 1986).

II.- La comunicación neuronal en la Retina

El circuito neuronal más sencillo en la retina consiste del flujo de información tri-neuronal entre un fotorreceptor-célula bipolar-célula ganglionar (Bonting, 1976). Como se deduce de la ultraestructura de las sinapsis retinianas, descrita anteriormente, la cadena de información trineuronal es susceptible de modificarse al nivel de ambas capas plexiformes.

La existencia de uniones comunicantes entre los diferentes fotorreceptores sugiere de inmediato que la estimulación de uno de ellos afecta de manera notable al adyacente. El hecho de que las sinapsis Ph-H sean recíprocas refuerza esta noción. Además, es probable que el fenómeno se repita al nivel de la CPI, con la existencia de uniones comunicantes entre las A y las A y las B. Finalmente, la existencia de prolongaciones de las células IP en ambas capas plexiformes indica que hay una especie de retroalimentación entre ambas capas sinápticas.

Las respuestas electrofisiológicas provocadas por la luz son diferentes en cada interneurona retiniana. Primero, se debe considerar que las únicas células que tienen

respuestas en forma de espigas, o sea, que generan potenciales de acción dentro de la retina, son las A y las G. Los Ph y el resto de las interneuronas despliegan su respuesta en forma de cambios graduales y sostenidos en su potencial de membrana, ya sea en dirección despolarizante o hiperpolarizante (Pasantes-Morales y Morán, 1988; Wässle y Boycott, 1991).

Como se ha mencionado anteriormente, la respuesta del Ph -cono o bastón- al estímulo luminoso es la hiperpolarización de la membrana. La magnitud de la hiperpolarización puede ser desde un potencial de reposo de -30 mV hasta -70 mV, como ocurre en los bastones (Voaden, 1976). En el caso de los bastones, el potencial de membrana regresa lentamente al valor que presenta en la oscuridad y la respuesta no se desvía con la iluminación difusa, mientras que los conos reducen el nivel de su respuesta con este tipo de iluminación (Voaden, 1976).

Las H son las responsables de lo que se conoce como el potencial "S". Este potencial intracelular refleja la hiperpolarización sostenida de la H, desde -30 mV hasta -80 mV, en respuesta a un estímulo luminoso brillante (Kaneko, 1987). Los diferentes tipos morfológicos de las H; de la H₁ a la H₃ conectadas con conos y la célula horizontal conectada con bastones (RH), presentan cada uno, una forma particular del potencial "S". Esto involucra la respuesta de un tipo de H específico a diferentes tipos espectrales de iluminación (revisado por Kaneko, 1987).

El campo receptivo de una neurona retiniana es la medida del diámetro máximo de un estímulo luminoso circular que provoque una respuesta electrofisiológica en aquella neurona. Las neuronas retinianas se agrupan en categorías, con base en el tipo de

respuesta electrofisiológica que provoque un estímulo luminoso al incidir sobre su campo receptivo. En este sentido, las células B pueden presentar una hiperpolarización, o despolarización, sostenida y gradual en respuesta a un estímulo luminoso colocado en el centro de su campo receptivo. Ambos tipos de respuesta, hiperpolarización o despolarización, se reducen cuando se acompañan de un anillo luminoso concomitante con la iluminación central (Bonting, 1976).

Las B que responden con una despolarización a la iluminación central se conocen como "ON" -o como B despolarizantes (DPB), pues su acción sobre la postsinapsis es despolarizante. Las B que se hiperpolarizan son las "OFF", también llamadas B hiperpolarizantes (HPB), ya que hiperpolarizan a las neuronas postsinápticas (Bonting, 1976). Las B que reciben su entrada de bastones se conocen como B de bastones (RBC) y siempre se despolarizan en respuesta a la iluminación central. En la actualidad se sabe que tanto la ON como las OFF reciben su entrada de conos, por lo que se les conoce como bipolares de conos (CB). (Wässle y Boycott, 1991; Sterling *et al.*, 1986).

Las A son células que disparan en espiga; su respuesta, transitoria, se presenta al inicio y al final de la estimulación luminosa (Bonting, 1976). La respuesta de las A es difícil de analizar por el hecho de que se han descrito hasta 30 tipos diferentes de ellas en cada clase de vertebrados (Marc, 1986; Wässle y Boycott, 1991), además de que las interconexiones sinápticas con el resto de las interneuronas es múltiple, así como entre sí mismas, tanto por sinapsis químicas como por uniones comunicantes (Marc, 1986).

Entre las A, el tipo conocido como AII es el mejor caracterizado ya que, en los mamíferos, ésta constituye el único relevo de las RBC (Sterling *et al.*, 1986). En todas las

clases de vertebrados se ha descrito una A semejante a la AII, sea por su morfología, localización, presencia de un neurotransmisor putativo (la glicina) o interconectividad sináptica (Marc, 1986; Wässle y Boycott, 1991).

La AII recibe su entrada sináptica de las RB y a su vez establece sinapsis químicas con las dendritas de G-OFF en la CPI, tanto como sinapsis eléctricas con las CB ON en la misma capa (Sterling *et al*, 1986). La AII, por estudios autorradiográficos, se considera como glicinérgica (Pourcho y Goebel, 1990), y se sugiere su papel como una interneurona inhibitoria, además de que tiene uniones comunicantes con otras A putativamente dopaminérgicas (Marc, 1986). Debido a esto, su participación en los microcircuitos de la CPI ha sido revisado extensivamente (Wässle y Boycott, 1991; Boss *et al*, 1993).

El registro de las respuestas de las G a la estimulación luminosa se caracterizó en forma inicial por Hartline en 1938 -referido por Pasantes-Morales y Morán, 1988-, quien describió que la tasa de disparo espontáneo en las G podía aumentarse en unos casos, o disminuirse en otros, como resultado de la iluminación. El primer tipo fue definido como G "ON"; el segundo como G "OFF". Más tarde, Kuffler (1953, referido por Pasantes-Morales y Morán, 1988) demostró que la respuesta de una G a un estímulo luminoso en el centro de su campo receptivo, fuera del tipo ON ú OFF, se disminuye por la estimulación concomitante con un anillo luminoso. Estos resultados sugirieron que los campos receptivos adyacentes presentan respuestas antagónicas a la luz, lo que ha derivado en el concepto de la organización antagónica centro-derredor de los campos receptivos de las G en la retina de los vertebrados (Wässle y Boycott, 1991; Pasantes-

Morales y Morán, 1988).

Con respecto a la ultraestructura de estos tipos neuronales, Famiglietti y Kolb (1978) demostraron que la ramificación dendrítica de las G-ON se extiende preferentemente en la sublámina *b* (distal con respecto a la capa ganglionar) de la CPI y que la ramificación dendrítica de las G-OFF lo hace en la sublámina *a*.

Todavía existe una distinción fisiológica más para las G, conforme se caracterizaron varios tipos por el registro intracelular en la retina del gato. Un tipo de ellas presenta lo que se denomina suma espacial, que es la adición o cancelación en la frecuencia de respuesta cuando un estímulo luminoso en forma de reja se mueve a los lados de su campo receptivo. Como resultado del análisis matemático, la armónica secundaria de estas respuestas es una línea recta y caracteriza a las G "X". El otro tipo fisiológico, las G "Y", no suma espacialmente las respuestas, o sea que no hay adición ni cancelación de las amplitudes cuando el estímulo luminoso pasa por los bordes del campo receptivo. El componente fundamental de la respuesta y la armónica secundaria, es decir, la función que describe la respuesta y su derivación matemática, son funciones sinusoidales que se intersectan (Enroth-Cugell y Robson, 1966); la misma caracterización se ha logrado para las G del ratón (Stone y Pinto, 1993).

Boycott y Wässle (1974), trabajando con la retina del gato, han demostrado que existen 2 grandes tipos morfológicos de G: las G- α , de soma grande y árbol dendrítico muy extenso y poco ramificado; y las G- β , de soma mediano y con el árbol dendrítico pequeño y muy densamente ramificado. Esta descripción corresponde con la actividad

fisiológica; así el tipo β se caracteriza fisiológicamente como X; y, por su parte, el tipo α corresponde al Y (Boycott y Wässle, 1978; Sterling *et al*, 1986).

En los primates no se ha encontrado un equivalente de los tipos fisiológicos X ó Y caracterizados en la retina del gato, de modo que una extrapolación a la fisiología de la retina del humano aún se encuentra lejos. Una primera aproximación a ésta se encuentra en la caracterización de los tipos de células G presentes en el mono macaco; en la retina del cual se han definido distintos tipos, con base en la propiedad de responder a la dirección del movimiento de los estímulos luminosos. Los tipos caracterizados para el mono son las G "P" y las "M", definidos por el sitio de su primer relevo sináptico: el núcleo parvocelular (P) o el núcleo magnocelular (M) del cuerpo geniculado lateral (Shapley y Perry, 1986).

El hecho de que las B son las neuronas que conectan directamente con las G, ha permitido correlacionar los tipos ON y OFF entre células bipolares y ganglionares. La conexión de las B-ON con las G-ON y lo correspondiente para el tipo OFF se ha demostrado en todas las clases de vertebrados (Bonting, 1976). Para los mamíferos esta noción se ha extendido hasta llegar al concepto de que, para las CB, la conectividad sobre las G no se restringe de forma unívoca ON-ON ú OFF-OFF, sino que el campo receptivo de una G resulta de la actividad promedio de las conexiones que recibe tanto de CB-ON y CB-OFF (Sterling *et al*, 1986).

En los mamíferos se ha estudiado más intensamente la organización de los campos receptivos de las G, así como su organización antagonista centro-derredor. Aunque

inicialmente se propusieron para el gato, ahora se ha extendido la noción de que en los mamíferos existen tres vías principales que terminan en las G: dos que se inician en conos y una en bastones (Sterling *et al*, 1986).

Una de las vías de conos termina en las G-ON β . Sobre este tipo celular, en la sublámina *b* de la CPI, convergen 2 tipos de CB: CBB1 y CBB2. La primera de ellas se despolariza por la iluminación central de su campo receptivo; la segunda se hiperpolariza ante la misma clase de estímulo. Puesto que ambas convergen sobre una G que aumenta su tasa de disparo por la iluminación central -propriadamente, una G-ON- la respuesta de las CB es, en un caso, un aumento en la liberación de un neurotransmisor despolarizante; en el otro, la disminución de la liberación de un neurotransmisor hiperpolarizante. La suma de entradas sobre la G-ON resulta en una despolarización neta y, por lo tanto, en un aumento en las tasa de disparo (Sterling *et al*, 1986).

La otra vía de conos actúa de forma similar, aunque en sentido inverso. Sobre las FF β , en la sublámina *a*, convergen una CBA1 que se hiperpolariza por la estimulación luminosa y una CB un neurotransmisor excitatorio y la CBA2 uno inhibitorio; de las entradas sobre la G-OFF resulta en una hiperpolarización neta y, consecuentemente, en una disminución en la tasa de disparo como respuesta a la iluminación en el centro del campo receptivo.

La vía proveniente de bastones se distingue en que las RB no hacen su primer relevo en G, sino en un tipo de A. Esta es la AII, descrita anteriormente. La AII mantiene uniones estrechas con los axones de las CB-ON, en la sublámina *b* de la CPI y establece sinapsis químicas con las dendritas de las G-OFF, tanto α como β , en la

sublámina a. Puesto que existen muchos datos que indican que la AII es glicinérgica (Pourcho y Goebel, 1990; Marc, 1986; Wässle y Boycott, 1991), es plausible que actúe como una interneurona inhibitoria para la vía de las G-OFF y como una interneurona excitatoria para la vía de las G-ON (Sterling *et al*, 1986; Wässle y Boycott, 1991).

Los bastones utilizan la vía de conos, ya que tienen uniones comunicantes que mantienen a los Ph comunicados. De modo que es probable que la luz incidente sobre un cono o un bastón provoque un flujo de información concomitante, por dos vías, dentro de los circuitos retinianos (Sterling *et al*, 1986).

Si bien el análisis de estos circuitos se complica por el hecho de que cada BC hace sinapsis con varios Ph, en la fovea la vía trineuronal Ph-B-G es estricta, en el sentido de que un cono conecta con una B y ésta con una G. En esta región de la retina la resolución cromática es máxima, aunque la resolución en intensidades de luz se vuelve mínima. Se ha propuesto que este arreglo representa el estado más reciente en la evolución del ojo (Wässle y Boycott, 1991).

Al revisar las vías y circuitos retinianos, es importante enfatizar que diversas líneas de evidencia sugieren que el neurotransmisor que maneja los Ph es el mismo, independientemente del tipo de cono o de bastón que se trate; además de que tal molécula parece ser el ácido glutámico (Marc, 1986; Miller y Slaughter, 1986, Pourcho y Goebel, 1990). De esta manera, la dicotomía inicial entre B-ON y OFF se debe al tipo de receptor que presentan estas células. Esto significa que, aunque el neurotransmisor es el mismo, el mensaje que transmite depende de la célula

que lo recibe.

La segunda particularidad de los circuitos retinianos es que, pese a que la respuesta de las B-OFF está bien caracterizada, y sus conexiones sinápticas con G-ON también (Sterling *et al*, 1986), no se ha encontrado evidencia suficiente de que alguna de estas células maneje un neurotransmisor de tipo inhibitorio.

EL PAPEL DE LA GLICINA DENTRO DE LA COMUNICACION NEURONAL EN LA RETINA

Desde los trabajos iniciales del grupo de Aprison (Aprison, 1990), la función transmisora de la glicina se restringió a la médula espinal y comenzó a considerarse al GABA como el neurotransmisor inhibitorio de las estructuras supraespinales. No obstante, la caracterización de la transmisión sináptica de los anfibios demostró sitios de unión de alta afinidad de estricnina-³H en la corteza cerebral y en la retina de la rana (Müller y Snyder, 1978; Borbe *et al*, 1981), así como un sistema de alta afinidad para la acumulación de glicina (Voaden, 1976).

El papel de la glicina en la comunicación neuronal ha sido abordado con las más diversas técnicas, como son la autorradiografía, la inmunocitoquímica, la neuroquímica y la electrofisiología. No obstante, la función, o las funciones de este aminoácido dentro de la retina no han quedado suficientemente claras.

I.- Eventos electrofisiológicos

La actividad eléctrica global de la retina se refleja en el electroretinograma. En la figura 5 se muestra la respuesta de la retina a la estimulación luminosa. Como puede apreciarse, se distinguen varias ondas: las ondas *a*, *b* y *c*, que son rápidas y se siguen por una serie de oscilaciones, las que se mantienen hasta que la retina alcanza un nivel de despolarización estable durante la foto-estimulación continua. La onda *a*, que es una respuesta de hiperpolarización, se debe a la participación de los fotorreceptores; las

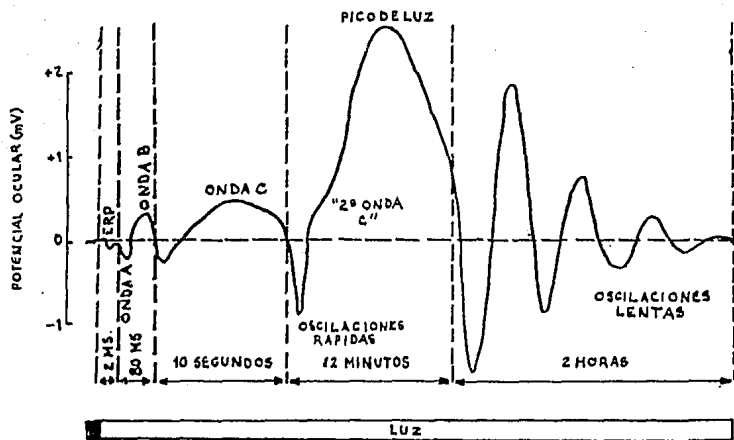


Figura 5.- Electroretinograma de un mamifero. Se muestran todas las ondas de que se compone, asi como la duraci3n de las mismas. Tomado de Riesgo-Escovar, 1988.

ondas *b* y *c* son las respuestas de la retina neural y de la despolarización apical del epitelio pigmentario de la retina (EPR). La modificación global del electroretinograma es uno de los análisis iniciales para evaluar el papel transmisor de una molécula dentro de la retina.

La taurina deprime la onda *b* del electroretinograma del pollo, aunque este efecto puede antagonizarse por estricnina, lo que sugeriría que los efectos de la taurina están mediados por el receptor postsináptico de glicina. Esta misma hiperpolariza a las células H de los peces, a la vez que reduce sus potenciales en respuesta a la luz, mientras que la infusión de estricnina 10 μM aumenta la onda *b* del electroretinograma (Marc, 1986). Estos últimos resultados indican que la glicina actúa como neurotransmisor inhibitorio al nivel de las interneuronas de primer orden en la retina.

Una gran cantidad de reportes ha demostrado consistentemente la carencia de alguna respuesta cuando la glicina se aplica sobre los fotorreceptores (Marc, 1985).

En la retina de la carpa la aplicación iontoforética de glicina sobre la CPI suprime la actividad eléctrica de las células G, la espontánea y la provocada por la luz. En el tritón, la glicina hiperpolariza débilmente a las B despolarizantes (DPB) -ó B-ON- observándose cambios pequeños en la conductancia. En las B hiperpolarizantes (HPB) -ó B-OFF- la hiperpolarización provocada por glicina es mucho mayor y se asocia con incrementos en la conductancia de 5-10 $\text{M}\Omega$; la estricnina reduce esta conductancia (Marc, 1985).

En la retina de la carpa, Wu y Dowling (1981) registraron la respuesta intracelular de las H a la aplicación de glicina, la cual fue hiperpolarizante a dosis en el intervalo de 0.1-1 mM. Como el tipo neuronal registrado fue la H_2 , conectada con conos, y ya que en

particular se abolieron las respuestas despolarizantes a la luz roja, se propuso que la glicina pudiera participar en los microcircuitos que median, o modulan, las respuestas a la luz roja, en los que intervienen las H_2 de los peces (Wu y Dowling, 1981).

Los anfibios han sido particularmente utilizados para los estudios electrofisiológicos de la retina de los vertebrados, por lo que la mayoría de los datos sobre tipos neuronales particulares y microcircuitos retinianos han sido generados en esta clase de vertebrados.

La caracterización más completa de los efectos de la glicina en la retina de los anfibios se realizó por Miller y colaboradores (Miller *et al*, 1981) con el tritón. Mediante el uso de la copa óptica en perfusión continua y el registro intracelular de neuronas identificadas, estos investigadores demostraron que la glicina aplicada en bajas concentraciones hiperpolariza a las H, un efecto que pudo ser bloqueado por Co^{2+} . Las HPB se hiperpolarizaron por el aminoácido al tiempo que redujeron su respuesta a la luz. Por otra parte, el antagonismo centro-derredor de las DPB y las HPB no se bloqueó con estricnina; al contrario, las respuestas de las HPB aumentaron con la aplicación del alcaloide. Esto señaló que dichas células estaban inhibidas tónicamente por la glicina (Miller *et al*, 1981).

En la misma preparación, Miller *et al* (1981b) encontraron que la glicina reducía la resistencia de entrada de las A y de las G, en alrededor de 100 $M\Omega$. Pese a la magnitud, el cambio no se asoció con una desviación del potencial de membrana en las A, aunque sí con la hiperpolarización de las G. En este estudio se pudieron separar dos poblaciones de G: sensibles e insensibles a glicina, lo que resultó complementario con la sensibilidad

al GABA (Miller *et al*, 1981b).

Finalmente, Miller y colaboradores (1981c) distinguieron las entradas inhibitorias sobre las G con el uso de estricnina, picrotoxina y bicuculina, de tal manera que las G clasificadas como ON, OFF y ON-OFF se asociaron con 4 tipos de A: ON (GABAérgica), OFF (glicinérgica) y dos de tipo ON-OFF: uno GABAérgico y otro glicinérgico. La acumulación de estos datos llevó a este grupo a proponer que: a) si la inhibición centro alrededor de las B se realizaba a nivel de la CPE por las H, éstas no eran GABAérgicas ni glicinérgicas; b) que las H se comunicaban con un tercer tipo neuronal, que maneja GABA o glicina, y cuyo efecto es despolarizante; d) que existe una inhibición tónica sobre las G, ya sea GABAérgica o glicinérgica, a la que se superimpone la inhibición provocada por la luz. Todo esto sugirió que los mecanismos GABA- y glicinérgicos, dirigidos al nivel de las G, tienen un papel muy importante para definir la organización del campo receptivo.

La salamandra tigre ha sido otro de los anfibios utilizados en los trabajos electrofisiológicos de la retina. Yang y Wu (1989) probaron los efectos de la exposición prolongada a la luz y de la infusión de glicina y GABA en la respuesta de las H en la copa óptica perfundida. La exposición luminosa prolongada aumentó el tiempo para alcanzar la respuesta pico a un estímulo luminoso, un efecto que se reprodujo con la aplicación de bicuculina y de glicina en dosis altas (1-3 mM). Sin embargo, los efectos de glicina desaparecieron por co-aplicación de bicuculina. La estricnina antagonizó los efectos de la glicina, pero no produjo ninguno *per se*, además de que la glicina aumentó GABA radiactivo de las H. Esto sugirió que el GABA modula la respuesta a la

luz de las H y que ese aminoácido se libera en respuesta a la acción de glicina, lo que finalmente sugirió la existencia de una vía GABAérgica y otra glicinérgica, interdependientes en la CPE de esta retina.

La idea tomó más fuerza con los trabajos de Stockton y Slaughter (1991), quienes encontraron, por registro intracelular en la retina de la salamandra, que el GABA y la glicina despolarizan a las H. Como los efectos del GABA se antagonizaron por picrotoxina y los de la glicina por estricnina y picrotoxina, se dedujo que la glicina actuaba en un circuito que finalizaba en las H. Con el uso de una preparación semejante, pero registrando en "whole-cell patch-clamp", Gilbertson y sus colaboradores (1991) reportaron que el GABA y la glicina aumentaron la conductancia al Cl⁻ en las membranas de las H. Borges y Wilson (1991) extendieron estos hallazgos con los efectos duales de la glicina sobre las H: de hiperpolarización a dosis menores que 50 μ M y de despolarización y reducción de la respuesta a la luz por aplicación de dosis en concentraciones milimolares. En este caso se encontró un aumento en la resistencia membranal, provocado por glicina, pero sin alterar el balance de entrada de conos y bastones sobre las H.

Todo esto indica que, en la salamandra al menos, existe un microcircuito dentro de la CPE en el cual la glicina participa modulando la acción del GABA sobre las H; que este microcircuito regula la cinética de las respuestas a la luz, y que la glicina no altera las entradas presinápticas entre fotorreceptores y H, sino entre las H mismas.

Una explicación plausible a los diversos efectos de la glicina dentro de la retina de los anfibios fue la propuesta por Miller y Dacheux (1983), quienes midieron la actividad

de Cl^- en varios tipos neuronales. La comparación entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio del Cl^- (E_{Cl^-}) señaló que: las G tienen un E_{Cl^-} más negativo que el potencial de membrana, así que un aumento en la conductancia a este ión hiperpolarizaría a la célula; las A y las B tienen un E_{Cl^-} semejante, es decir, el Cl^- está distribuido de manera pasiva entre ellas y el medio; y que el E_{Cl^-} de las H es más positivo que el potencial de membrana, lo que provoca que un aumento en la conductancia al Cl^- sea despolarizante.

Debido a los datos generados en los peces y los anfibios, expuestos arriba, se ha propuesto que la glicina juega un papel importante en la comunicación sináptica dentro de los microcircuitos retinianos de ambas capas plexiformes de los ectotermos. Al contrario, en los mamíferos las respuestas electrofisiológicas provocadas por glicina, o modificadas por ésta, se han restringido a la CPI, lo que, aunado a los datos histológicos y neuroquímicos, ha generado la idea de que en las retinas de los mamíferos los circuitos glicinérgicos existen sólo en la CPI.

En los mamíferos se han caracterizado 3 tipos de neuronas glicinérgicas: A, B y G (Marc, 1985; Pourcho y Goebel, 1990). En la copa óptica del gato, la infusión de estricnina aumenta la tasa de disparo de las G ON beta; pero la misma droga no afecta las G OFF beta, las OFF alfa ni las OFF-ON alfa (Marc, 1985). En el conejo las vías ON y OFF son sensibles a glicina (Pourcho y Goebel, 1990): tanto el subtipo β como el α de estas G pierden el componente transitorio de su respuesta OFF, mientras que las G ON

α también pierden el componente transitorio, pero de su respuesta ON (Marc, 1985).

En los ratones, la respuesta de las G a la glicina se ha investigado en los individuos normales y en los mutantes espásticos, deficientes en el RGly, permitiendo correlacionar la función de la retina cuando naturalmente ocurre una deficiencia en la transmisión glicinérgica. Stone y Pinto (1992) compararon la respuesta extracelular de las G de los ratones espásticos contra la de los normales, con el resultado de que los mutantes carecieron de las respuestas antagonistas centro-derredor. Otras de las diferencias resultantes fueron una mayor afinidad de la estricnina para bloquear las respuestas a la luz en los animales mutantes ($K_i = 0.81$ nM); tanto como la carencia de un componente sostenido en dicha respuesta. Debido a la selectividad en la deficiencia glicinérgica, fue propuesto que al mecanismo de la respuesta centro-derredor le subyace una vía que requiere del RGly, lo mismo que al componente transitorio de la respuesta a la estimulación luminosa (Stone y Pinto, 1992).

Con respecto a las células A, se han correlacionado la actividad eléctrica con las características histológicas que les permiten ser propuestas como glicinérgicas. Así, la AII -ó A₂gly- putativamente glicinérgica por la acumulación del aminoácido radiactivo, se dirige en sus respuestas por los bastones, despolarizándose al inicio de la estimulación luminosa (Pourcho y Goebel, 1990). Los datos histológicos con técnicas argénticas han hecho claro que esta AII mantiene uniones en hendidura con los axones de las CBB, en la sublámina b -ó sublámina ON- de la CPI, mientras que en la sublámina a -ó sublámina

OFF- establece sinapsis químicas con las G OFF alfa y beta (Sterling, *et al*, 1986).

La A8 es un tipo neuronal que responde a las respuestas luminosas mediadas por conos, de modo que se hiperpolariza con la luz; la A4 tiene la misma respuesta, pero además conecta con las B de bastones (RB). Ambos tipos se marcan muy conspicuamente con glicina-³H en la retina del hombre (Marc, 1985).

En la rata, la infusión de glicina en la retina provoca corrientes de Cl⁻ en las AII, las que son especiales por resultar sensibles a bicuculina y a estriquina Boss *et al*, 1993).

La idea de una B glicinérgica se apoya por los datos autorradiográficos (Pourcho y Goebel, 1990; Marc, 1985). Las B putativamente glicinérgicas pueden desempeñar un papel preponderante en la comunicación neuronal retiniana. Por una parte, puesto que son las primeras interneuronas y debido a su respuesta despolarizante a la luz, de alguna manera deberían dirigir, por sí mismas, algunas respuestas de las vías OFF. (Sterling *et al*, 1986).

La participación de una B glicinérgica inhibitoria en los microcircuitos retinianos ha tratado de explicarse por Pourcho y Goebel (1990), en lo que llamaron la hipótesis "push-pull" de las B glicinérgicas. Se sabe que existen dos poblaciones convergentes de B de conos sobre las G: excitadoras e inhibitoras. Justo estas últimas se proponen como glicinérgicas, debido a las siguientes evidencias:

a) las G ON beta reciben una entrada despolarizante de las Bb, y una hiperpolarizante

de las Bb₂; por su parte, las G OFF beta se hiperpolarizan por las Ba₂ y se despolarizan por las Ba₁;

b) todas las terminales de las células B en la sublámina *b* se marcan con glicina-³H;

c) al ácido amino-fosfonobutírico (APB), que inhibe a las B ON, provoca que disminuyan las respuestas de las G ON, pero aumenta las respuestas de las G OFF; sólo el efecto del canal OFF desaparece con la aplicación concomitante de estricnina.

De esta manera es factible que, el circuito en el que participe la glicina, esté formado por B ON glicinérgicas que contacten con la G OFF. Si, de manera alternativa, estos mismos eventos afectados por estricnina no son mediados directamente por las BC, sino por A, todas las B de conos serían glutamatérgicas, pero manejando glicina como co-agonista del glutamato en el receptor tipo NMDA (NMDAr), lo que explicaría la alta concentración de ambos aminoácidos dentro de los mismos tipos de células B (Pourcho y Goebel, 1990).

Esta sugerencia, que se apoya parcialmente en los estudios autorradiográficos de glicina-³H y en las respuestas electrofisiológicas provocadas por este aminoácido, carece de la evidencia directa de los sitios de unión de glicina, ya sea en el RGly o dentro del complejo NMDAr. La evidencia hacia cualquiera de ambas posibilidades dilucidaría la participación de las B glicinérgicas en la CPI, en particular y, en general, de la glicina dentro de la comunicación neuronal en la retina de los mamíferos.

En resumen, la evidencia experimental disponible indica que en los peces y los

anfibios existen microcircuitos glicinérgicos en ambas capas plexiformes, al contrario de lo que ocurre en los mamíferos, en donde éstos parecen restringirse a la capa plexiforme interna. Puede ser que, la función global de los microcircuitos glicinérgicos radique en la transmisión lateral dentro de las capas plexiformes, es decir, que las respuestas electrofisiológicas a la glicina modulen la capacidad de la respuesta a la luz. Alternativamente, el papel de la glicina puede ser el de acoplar los distintos tipos neuronales.

En el primer caso, los efectos de la glicina serían ejercidos por B o por las AII, que conectan directamente con las células G. El mecanismo puede ser la estimulación de la AII glicinérgica, que resultaría en la hiperpolarización de la G-OFF, con la que establece sinapsis químicas (Sterling *et al*, 1986); pero la despolarización inicial, ocasionada sobre la AII por la RB, se transmitiría mediante las uniones estrechas a las Bb₁, en la sublámina ON. Finalmente esta última estimularía a la G-ON con la que establece sinapsis químicas, alterando su balance de entradas excitatorias e inhibitorias (Sterling *et al*, 1986) hacia una despolarización neta; la G-ON sería excitada -indirectamente- por un estímulo luminoso que no tocó el centro de su campo receptivo.

En el caso del acoplamiento de los tipos neuronales, una célula IP glicinérgica, como la que existe en anfibios y peces, puede ser estimulada en la CPI. La retroalimentación de la IP sobre la CPE consistiría en la despolarización ó hiperpolarización de la célula H con la que hace sinapsis, a través del RGLy, dependiendo del E_{Cl} de la H. Si la H se despolariza, el resultado sería la liberación de un neurotransmisor inhibitorio por parte de la H, con acción sobre las sinapsis recíprocas que mantienen con los fotorreceptores, o

bien con las B. Así, la inhibición sobre una vía, por el fenómeno antagónico centro-dorador, se refuerza con la retroalimentación mediada por la célula IP, desde la CPI hacia la CPE.

II.- Concentración de glicina libre en la retina

Una de las primeras evidencias de la participación neuroactiva de la glicina en la retina se obtuvo al medir los niveles del aminoácido en dicho tejido. La concentración de glicina en la retina abarca un intervalo desde 0.63 hasta 7 $\mu\text{molas/g}$ de tejido, conforme se determinó en peces, anfibios, aves y mamíferos (Marc, 1985; Voaden, 1976). Estas concentraciones son similares a las que se encuentran en la médula espinal y en la región pontina de la rata (3-5 $\mu\text{molas/g}$) (Marc, 1985).

Con respecto a la SHMT, la retina posee una actividad alta, que correlaciona con los niveles de glicina (Dasgupta y Narayanaswami, 1982; Marc, 1985); lo que sugiere que este aminoácido está involucrado en otras funciones adicionales al metabolismo celular en la retina.

III.- Acumulación y liberación de glicina por la retina

Como con el resto de las sustancias neuroactivas, la acumulación y liberación de glicina por las neuronas que supuestamente la utilizan como transmisor, es uno de los

datos requeridos para apuntalar ese papel. Tales sistemas de transporte requieren mostrar una alta afinidad por la molécula, con constantes de afinidad (K_m) del orden de micromolar, así como mostrar dependencia de Na^+ , de temperatura y de energía metabólica.

Un sistema con estas características se ha descrito para las retinas del pez dorado ($K_m = 8 \mu M$), la rana ($K_m = 17 \mu M$) y el conejo ($K_m = 28 \mu M$) (Marc, 1985). El transporte realizado por este sistema depende de Na^+ y es sensible a la ouabaína y a los ionóforos de protones (Pourcho y Goebel, 1990). La estereoespecificidad del transporte de glicina se ha demostrado al no inhibirse por concentraciones cien veces mayores de serina, alanina ni prolina (Chin y Lam, 1980; Pourcho y Goebel, 1990).

En la retina de la rana Salceda (1989) reportó un transporte con las mismas características descritas, con una K_m de $100 \mu M$ en los sinaptosomas provenientes de la capa plexiforme externa (CPE) y de $45 \mu M$ en los sinaptosomas de la capa plexiforme interna (CPI).

La liberación de glicina de la retina se ha demostrado, *in vitro*, por estimulación despolarizante con altas concentraciones de K^+ , en las retinas del pez dorado, la rana, el conejo y los sinaptosomas del pollo (Marc, 1985). En la retina del conejo, la glicina se libera por estimulación luminosa (Pourcho y Goebel, 1990).

Los experimentos *in vivo* han demostrado la liberación de glicina -medida por el flujo de glicina endógena- estimulada por la luz, de las retinas de la rata y el gato (Coul y Cuttler, 1978; Ehinger y Lindberg-Bauer, 1976 y 1974). Tanto *in vitro* o *in vivo*, la

liberación es dependiente de la presencia de Ca^{++} . Este tipo de evidencia se ha extendido a los sinaptosomas de la retina de la rana, en donde además se ha demostrado que la liberación no se altera aun cuando se bloqueen los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Salceda, 1989).

Asímismo, se ha demostrado en la retina completa de la rana que la liberación de glicina estimulada por la luz, así como por concentraciones despolarizantes de K^+ , puede ocurrir a través de un mecanismo independiente de Ca^{++} (Marc, 1985; Smiley y Bassinger, 1990). Este tipo de liberación se ha propuesto como mediada por el transportador dependiente de Na^+ , aunque su funcionamiento no ha sido delineado claramente.

Con técnicas autorradiográficas se han identificado, al nivel de la microscopía de luz, a las neuronas retinianas que acumulan glicina- 3H . En principio cada una de las clases de vertebrados ha sido revisada al respecto, con el uso de alguna especie representativa. De manera que, la información concerniente a las neuronas marcadas con glicina- 3H , señala a diversos tipos y subtipos celulares como glicinérgicos. A pesar de la diversidad de propuestas que genera tal cantidad de datos, es claro que en todas las clases de vertebrados hay una gran población de células amacrinas glicinérgicas.

Los primeros trabajos autorradiográficos carecían de la definición necesaria para distinguir entre diferentes tipos celulares; como reflejo de ello, Voaden (1976) resumió la información existente, con la indicación de que la mayoría de las neuronas retinianas marcadas con glicina- 3H se localizaban en la capa nuclear interna (CNI), sugiriendo que podrían tratarse de A. Fue necesaria la introducción de las técnicas argentícas en

combinación con la autorradiografía para obtener datos más concisos. Estos fueron resumidos por Pourcho y Goebel (1990), quienes describen los siguientes resultados:

En la retina de los peces, entre 16% a 30% de las A acumulan glicina-³H. Las neuronas marcadas son de soma pequeño y presentan contactos pre y postsinápticos con otras A en la sublámina a de la capa plexiforme interna CPI.

Las retinas de los anfibios, representadas por las de la rana, el sapo y el tritón, también presentan un gran porcentaje de células A marcadas con glicina-³H, así como de otras neuronas localizadas en la capa de células ganglionares, que pudieran ser amacrinas desplazadas. En el tritón se han realizado los trabajos más finos, que contabilizan hasta el 38% de las A marcadas con glicina-³H. De entre ellas, se han distinguido al menos tres subtipos en cuanto a la localización en la CNI y en la ramificación de sus dendritas en las subláminas de la CPI.

La retina de la tortuga muestra dos tipos de A que acumulan glicina-³H: el tipo "A", de soma grande y una sola dendrita y el tipo B, con una ramificación dendrítica abundante entre la CPI y la CNI.

Las A marcadas en la retina del pollo pertenecen a diversos subtipos, determinados por la co-localización de glicina con diversos neuropéptidos, mientras que en la retina del pichón, la glicina-³H se encuentra en un sólo tipo de A.

La mejor caracterización de las neuronas glicinérgicas retinianas se ha recabado para los mamíferos, en particular para la retina del gato y de los primates, incluida la especie humana. En la retina del gato, la A más sobresaliente que muestra marca es la denominada A7 -ó ACII (Famiglietti y Kolb, 1975)-. La A7 extiende prolongaciones

dendríticas hacia la CPI, donde es postsináptica a las bipolares de bastones y presináptica a otras A y ganglionares OFF. Las otras A que acumulan glicina-³H son la A(Gly₁), que constituye el 18% del total de las A en la retina del gato y la A(Gly₂), que representa el 3%.

De acuerdo con la conectividad sináptica de las A marcadas con glicina-³H, Pourcho y Goebel (1990) han distinguido cuatro subtipos para la retina del gato. La clasificación de ellos tiene base en la posición que presentan dentro de la CNI y la estratificación de sus dendritas dentro de la CPI. Estas son la A3 y la A4, que ramifican en la sublámina *a*; la A8, que recibe sinapsis de B de conos y bastones y es biestratificada, o sea que ramifica en las subláminas *a* y *b*; y la A7.

Respecto a los primates, la autorradiografía con glicina-³H marca el 53% de las A en el hombre y en el mono. En el hombre, la A más conspicua es la A7; que además presenta la particularidad de tener uniones en hendidura con otras A que también acumulan glicina-³H.

A diferencia del marcaje autorradiográfico de las A con glicina-³H, algunos otros tipos de interneuronas retinianas sólo se marcan en una o dos clases de vertebrados. Esta selectividad indica que, en las diferentes especies de vertebrados, la glicina puede funcionar en más de un circuito, ya que su localización está restringida a un tipo celular con respecto a la especie.

Por ejemplo, en el pez dorado la autorradiografía de glicina-³H señala varias células IP (Dowling y Ehringer, 1978). La rana y el sapo también muestran IP con estas

características, y en el tritón y la salamandra, además de las A y las IP, algunas células bipolares (B) acumulan glicina-³H.

En los mamíferos se marcan un gran número de bipolares de conos (CBC) con glicina-³H; para las cuales se han descrito 6 subtipos morfológicos (Pourcho y Goebel, 1990).

La inmunocitoquímica de aminoácidos endógenos ha sido desarrollada a partir del uso de anticuerpos generados contra el aminoácido acoplado a albúmina de suero de bovino (Storm-Mathisen *et al*, 1990). La técnica, diseñada inicialmente para el GABA y el glutamato, pronto se extendió a la glicina y, desde luego, a su localización en las neuronas retinianas.

Los estudios realizados con esta técnica han servido de complemento a los datos originados a partir de los estudios autorradiográficos. Como en ellos, se han revisado todas las clases de vertebrados y se ha combinado el uso de la microscopía electrónica para el análisis de las neuronas inmunopositivas a glicina y sus contactos sinápticos (Pourcho y Goebel 1990).

En el pez dorado más del 30% de las A han resultado inmunopositivas a glicina; de entre éstas, la mayor parte ramifican sus dendritas en la sublámina a de la CPI. Del resto de neuronas en esta retina, sólo las interplexiformes han demostrado la misma inmunopositividad (Studholme y Yazulla, 1988).

En la retina de los anfibios la inmunopositividad a glicina confirmó y extendió los datos arrojados por la autorradiografía, con respecto a la existencia de varios tipos de

A glicinérgicas. Por otra parte, mediante la inmunopositividad a glicina se identificaron A que no acumularon glicina-³H en la autorradiografía, así como alguna B que se marcaron con glicina-³H no resultaron positivas al anticuerpo antiglicina (Ab-antigly) (Young y Yazulla, 1988).

La retina de la tortuga *Pseudomyces scripta* tiene dos tipos de A inmunopositivas a glicina, que difieren en el tamaño de su soma y en la ramificación dendrítica dentro de las subláminas de la CPI. Algunas IP muestran el mismo tipo de reactividad, lo mismo que varias células ganglionares (G) (Eldred y Chung, 1989).

Varias especies de mamíferos se han caracterizado por su inmunopositividad a glicina. Entre ellas, en la rata se ha reportado que el 50% de las A son positivas y el 28% de las B. En el gato, el porcentaje de A reactivas al Ab-antigly asciende al 50%, de B al 15% y de G al 13%. Por último, en la retina del macaco el 43% de A son positivas, observándose tres subtipos, y 40% de las B, con dos subtipos.

En la tabla I se presenta un resumen de los tipos neuronales retinianos que acumulan glicina-³H, o que presentan inmuno-reactividad semejante a glicina.

Por otra parte, también se han realizado estudios de co-localización de glicina con otras supuestas sustancias neuroactivas. Estos estudios demostraron que la glicina-³H se acumula por neuronas que son reactivas a neurotensina, encefalina, somatostatina (Weiler y Ball, 1984; Watt *et al*, 1985; Smiley y Bassinger, 1988; Wu y Lam, 1988) y los aminoácidos GABA y glutamato (Ball, 1987; Young y Yazulla, 1988; Owczaraza y Pourcho, 1989). En la rana las IP que acumulan glicina-³H son inmunorreactivas a

	AUTORRADIOGRAFIA	REACTIVIDAD INMUNOLOGICA	
		vs glicina (AbGly)	vs RGly (mAb)
pez dorado	A: (16-40%), IP	A (30%)	93 kDa: A, B, G
mantarraya	A (31%), B		
dipnoos	A, B		
<u>Rana temporaria</u>	A (21%), IP		
<u>Xenopus</u>	A (64%), IP		93 kDa: K
<u>Bufo marinus</u>	A (5%), IP		
tritón	A (29-40%), B (17-28%), G (7-24%)		
salamandra tigre	A (35%), B (20%), G (4%)	A (30-40%), B, IP, G	
tortuga	A, B, IP	A, IP, G	
pichón	A, B		
pollo	A (12%)		
cuyo	A, G		
rata	A, B (28%), G	A (50%) B (28%)	93 kDa: CFI α, β: CFI, G
conejo	A (52%)		93 kDa: CFI
gato	A (48%): Agly, (18%) A7 (18%), AGly, (3%) A3, A4, AB B: subláminas <u>a</u> y <u>b</u>	A (50%): A7, AB B: Bb, Bb ₂ (15%)	93 kDa: A, G α: CFI, G β: CFI, G
mono Rhesus	A, B de conos		
mono macaco	A (53%)	A (43%): A7, B: Bb (40-70%)	93 kDa: Ph, A, G α: CFI, CPE, IP β: CFI, A, G
hombre	A (31-53%): A7 B de conos (20%)		

Tabla I.- Las neuronas retinianas que se proponen como glicinérgicas en base a la evidencia de acumulación e inmunorreactividad por presencia de glicina endógena o de las proteínas del RGly (AbGly=antisuero vs glicina-albúmina; mAb=anticuerpos monoclonales vs las subunidades del RGly).

somatostatina (Smiley y Bassinger, 1988); en el pez dorado se encuentra co-localizada la glicina con el GABA (Ball, 1987) y el glutamato (Pourcho y Goebel, 1990); en la tortuga las neuronas inmunorreactivas a glicina también lo son para neurotensina (Weiler y Ball, 1984); en el pollo la inmunorreactividad a neurotensina, somatostatina y encefalina marca un pequeño porcentaje de neuronas que acumulan glicina-³H (Watt *et al*, 1985 y 1988).

Con la disponibilidad de los diversos anticuerpos generados contra las cadenas polipeptídicas del RGly, la técnica inmunocitoquímica contó con una herramienta más para evidenciar las sinapsis glicinérgicas. En particular, el anticuerpo de más fácil acceso ha sido el mAb 7a, generado contra el polipéptido de 93 kDa, que se localiza sobre la cara citoplásmica de la membrana. Dada la evidencia -expuesta anteriormente- de que esta proteína no sea integrante exclusiva del RGly, los datos obtenidos deben ser considerados con cautela. No obstante, a continuación se expone un resumen de los resultados generados en la investigación de los circuitos retinianos.

Jager y Wässle (1987) utilizaron el mAb 7a acoplado a una molécula fluorescente en la retina del gato. Así, encontraron la presencia del RGly sobre las G de centro ON y OFF. Más tarde, el mismo grupo no logró extender este tipo de resultados a las B de la retina de la misma especie, aun cuando, por datos electrofisiológicos, éstas se habían caracterizado como glicinoceptivas (Pourcho, comunicación personal, 1993).

La inmunorreactividad al RGly se localizó posteriormente en la CPE de la retina de *Xenopus* (Smiley y Yazzulla, 1990). En este trabajo la señal se localizó en membranas

postsinápticas a células IP, muy probablemente sobre células H, así como también en gran número sobre membranas subsinápticas a fotorreceptores, que se identificaron como conos. Estos resultados sugirieron que las sinapsis donde participan los fotorreceptores pueden ser moduladas por la glicina que difunda desde otras terminales (Smiley y Yazulla, 1990).

Por otra parte, en la retina del pez dorado la inmunorreactividad a RGly se ha localizado en las superficies lateral y proximal de los somas de diversas A; en la superficie distal de algunas G, en ambos casos presumiblemente postsinápticas a IP. El análisis en serie de estas preparaciones, hizo evidente el que las IP "glicinérgicas", a su vez, recibían entrada sináptica de H GABAérgicas (Yazulla y Studholme, 1991a).

En la retina del pez dorado se encontró que del 7% a 10% de las terminales de B postsinápticas a A son inmunorreactivas a RGly. Un dato más fue el que algunas de estas terminales, en forma de espínulas, son postsinápticas a procesos GABAérgicos, caracterizados éstos por inmunorreactividad a GABA y a la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). Así surgió la idea de que el GABA y la glicina actuaran en conjunto en algunas sinapsis dentro de la retina (Yazulla y Studholme, 1991b).

Pese a la gran cantidad de datos histoquímicos que sugieren la presencia del RGly en la retina de los vertebrados, pocos son los estudios que se han enfocado a la caracterización bioquímica de este complejo proteico. De manera aislada, Borbe y sus colaboradores (1981) demostraron la unión específica de estricnina-³H en las membranas sinaptosomales de la retina de los bovinos; Scafeffer y Anderson (1980) reportaron resultados similares en la retina de la rata. Estos trabajos adolecen de la localización

sináptica de la unión específica; además de que restringen la caracterización del RGly por la unión de estircnina-³H.

OBJETIVOS

Como se ha revisado, hasta la fecha existen numerosos datos de tipo electrofisiológico que indican la participación de la glicina en la transmisión sináptica intrarretiniana, lo mismo respecto a la localización de células que acumulan glicina y que mantienen una alta concentración de este aminoácido. Sin embargo, se carece del conocimiento acerca de las proteínas de membrana, es decir, de los receptores que median la acción de la glicina. Los datos referentes al RGly se restringen a la unión de estricnina y, por lo tanto, a las isoformas del receptor que son sensibles al alcaloide; mientras que los ensayos de unión de glicina-³H no han establecido una comparación con los de estricnina-³H. Puesto que la glicina actúa sobre el receptor a NMDA en un sitio insensible a estricnina, se requiere de la comparación entre los sitios de unión al RGly típico y de otros que puedan ser diferentes a los señalados por estricnina, tanto las formas del RGly insensibles a ésta, así como el sitio asociado al NMDAr. De esta manera, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Caracterizar la cinética y el perfil farmacológico de la unión de estricnina-³H en las fracciones membranales de la retina de la rana.
- Caracterizar la cinética y la farmacología de la unión de glicina-³H en las fracciones membranales de la retina de la rana.

- Comparar las propiedades de ambos tipos de unión y detectar, en su caso, las diferencias que indiquen la existencia de diversos receptores membranales para la glicina.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Las ranas que se utilizaron en los experimentos por describir se adaptaron a la oscuridad durante al menos 2 horas antes de sacrificarse.

Las ranas fueron sacrificadas por decapitación; se extrajo el globo ocular, se hemisectó y se separó la región anterior. De la copa óptica se separó la retina con ayuda de unas pinzas y se conservó en Ringer Krebs con la siguiente composición (en mM): NaCl 118; KCl 4.7; KH_2PO_4 1.2; CaCl_2 2.5; MgSO_4 1.17; glucosa 5.6; 35 de NaHCO_3 , pH 7.4. Todo el procedimiento se efectuó bajo luz tenue roja.

Aislamiento de membranas totales

Se homogenaron las retinas en 20 volúmenes de agua (peso/volumen) con un homogenador de vidrio; el homogenado se centrifugó a 500 g durante 10 minutos y se conservó el sobrenadante; el botón se resuspendió en el mismo volumen de agua, utilizando para ello una pipeta Pasteur y se repitió la centrifugación. El segundo botón se desechó y la mezcla de sobrenadantes se centrifugó a 71 000 g por 20 minutos. El botón, que contiene las fracciones membranales, se homogeneizó en el mismo volumen de agua y se repitió la centrifugación. Este procedimiento se repitió una vez más y el botón resultante se congeló a -20°C de 2-5 días, hasta que se utilizaron para el ensayo de unión de ligandos radioactivos.

Aislamiento de sinaptosomas y membranas sinaptosomales

Para aislar las membranas sinaptosomales se siguió el método reportado por Salceda (1989). Las retinas aisladas se colocaron en un vial con RKB y se agitaron suavemente durante un minuto; luego se pesaron y se homogenaron al 10% en una solución de sacarosa 0.28 M - $MgSO_4$ 100 μ M. El homogenado se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos. Se conservó el sobrenadante y se resuspendió el botón en el mismo volumen de la solución de sacarosa- $MgSO_4$, utilizando una pipeta de punta fina. Se repitió la centrifugación y el segundo botón se conservó como la fracción enriquecida en sinaptosomas de la capa plexiforme externa (P1). La mezcla de sobrenadantes se centrifugó a 11000 g durante 20 minutos; el botón correspondió la fracción P2, que está enriquecida en sinaptosomas de la capa plexiforme interna (Salceda, 1989).

Para aislar las membranas de cada fracción sinaptosomal, se homogenaron éstas en agua. El homogenado se centrifugó a 71 000 g por 20 minutos; se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en agua y se centrifugó nuevamente; el procedimiento se realizó 3 veces consecutivas. El botón final se congeló a $-20^{\circ}C$, hasta que se realizó el ensayo de unión, ó bien se resuspendió en 100 volúmenes del RKB carente de Na^+ y amortiguado con Tris-HCl 0.05 M a pH 7.4. El homogenado se incubó a $37^{\circ}C$ por 30 minutos en agitación continua (50 rpm). La incubación se detuvo por centrifugación a 71 000 g durante 20 minutos. El botón resultante se resuspendió en agua y se lavó una vez más; el botón final se congeló a $-20^{\circ}C$ hasta el día del ensayo de unión ("lavado").

Reactivos

La glicina-³H (43, 53 Ci/mmola) y la estircina-³H (13 Ci/mmola) se compraron a New England Nuclear.

La estircina se utilizó como sulfato de estircina (Sigma); los aminoácidos, la picrotoxina (PTX) y la bicuculina se obtuvieron de Sigma. Las drogas 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX), 6,7-ciano-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), 3-amino-1-hidroxipirrolidin-2-ona (HA966), ácido kinurénico (Kyn), ácido 7-cloro-kinurénico (7CIK) fueron de Tocris-Neuramin. El esteroide RU 5135 y el análogo de la estircina 2NH₂-estircina fueron un regalo del Dr. Federico Mayor Jr., de la Universidad Autónoma de Madrid.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y colaboradores (1951), utilizando albúmina de suero de bovino como patrón.

Ensayos de unión

Las membranas se resuspendieron en un amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.1), o en el Ringer Tris-HCl 0.05 M carente de Na⁺ (pH 7.4); el ensayo de unión específica se llevó a cabo por una modificación del método de Young y Snyder (1973). Las membranas (50-100 µg proteína), se incubaron en 1 ml de amortiguador, en presencia de glicina-³H ó estircina-³H y, en tubos en paralelo, con el ligando radioactivo

en presencia de 1 mM de glicina o de 100 μ M de estricnina, respectivamente.

La incubación se detuvo centrifugando a 71 000 g durante 20 minutos; se desechó el sobrenadante y el botón se lavó con 10 volúmenes del amortiguador frío. El botón se resuspendió en 0.1 ml de SDS al 0.1%, se transfirió a un vial y se le agregaron 5 ml de Tritosol (Fricke, 1975). La radioactividad se detectó en un contador de centelleo líquido, Beckman LS 1701.

La cinética de la unión específica se estudió en un intervalo de concentración del ligando radioactivo de 0 a 200 nM. La radioactividad asociada específicamente a las membranas se obtuvo de la diferencia entre las cuentas obtenidas del ligando radioactivo y aquel con un exceso de ligando frío. La unión específica representó entre el 80% al 95% de la unión total.

El cálculo de los parámetros de la constante de afinidad (K_D) y del número máximo de sitios de unión (B_{Max}) se realizó transformando los datos por el método de Rosenthal:

$$[\text{ligando-}^3\text{H unido}]/[\text{ligando libre}] = B + (k^* [\text{ligando-}^3\text{H total}])$$

donde la constante k es el inverso de la constante de afinidad. En la gráfica de la función, el intersección con las abscisas representa el número máximo de sitios de unión. Este análisis se refiere ordinariamente como de Scatchard; sin embargo, el método de Scatchard supone que se conocen el peso molecular y la concentración del receptor (Bylund y Yamamura, 1990).

Los experimentos de competencia se realizaron incubando las membranas con el ligando radioactivo en presencia de la droga a evaluar; el desplazamiento obtenido de

la unión total se refirió como un porcentaje de la unión específica, considerada como el 100% de la unión desplazada por 100 μ M de estricnina ó 1 mM de glicina. Cuando la droga causó un desplazamiento mayor al 60% de la unión específica se realizaron curvas de desplazamiento.

En las curvas de desplazamiento se incubó el tejido con una concentración constante del ligando radioactivo (2 nM) en presencia de concentraciones crecientes de la molécula a probar. De nuevo, se refirió el porcentaje de desplazamiento con respecto a la unión específica.

A partir de los datos de desplazamiento, se calcularon la concentración efectiva para desplazar el 50% de la unión específica (E_{C50}) del ligando radioactivo y el número de moléculas de la droga necesarias para desplazar una molécula de aquel (número de Hill n_H), con las curvas de desplazamiento trazadas por medio de computadora (E_{C50} , Inplot4 versión 4.03, Graph Pad Software) con base en la ecuación:

$$Ki = E_{C50} / (1 + L/K_D)$$

donde Ki constante de inhibición, L= concentración del ligando radioactivo y K_D = su constante de afinidad por el sitio, y de la transformación logit de los resultados:

$$\text{logit} = \ln (\% \text{ desplazamiento} / 100 - \% \text{ desplazamiento})$$

$\text{logit} = \ln_{10} [\text{droga}] * k + B$ $\text{logit} = \log_{10} [\text{droga}] * k + B$ donde k y B son constantes, con $k = n_H$ (Bylund y Yamamura, 1990).

RESULTADOS

Inicialmente se siguieron dos procedimientos paralelos para determinar la unión específica del ligando radioactivo: centrifugación y filtración. El método de filtración resultó inadecuado, ya que los filtros fijaron las moléculas radioactivas. Pese a que los filtros fueron tratados por pre-incubación en 100 mM de glicina, o 1 mM de estricnina, continuaron uniéndose a los ligandos radioactivos. Por esta razón, los resultados que se presentan se obtuvieron utilizando el método de centrifugación.

Unión de glicina-³H a las membranas totales de la retina de la rana

La unión de glicina-³H a las membranas totales de la retina de la rana es claramente menor en un amortiguador de fosfatos, o en un Ringer con Na⁺, que la unión que se obtiene en un Ringer sin Na⁺, amortiguado con Tris-HCl (0.05 M), sin importar si el tejido se utilizó inmediatamente a su aislamiento (membranas frescas) o si permaneció congelado de 2 a 5 días (membranas congeladas) (figura 6). La unión de glicina-³H en Ringer Tris-HCl carente de Na⁺ alcanzó un máximo a 10 minutos de incubación, tiempo a partir del cual disminuyó (30 y 60 minutos, figura 7) y presentó variaciones considerables entre 4°C, 25°C y 37°C de temperatura de incubación, siendo menor a 37°C (figura 8). Por otra parte, la unión específica disminuyó notablemente en aquellas membranas que permanecieron congeladas durante más de cinco días (no mostrado).

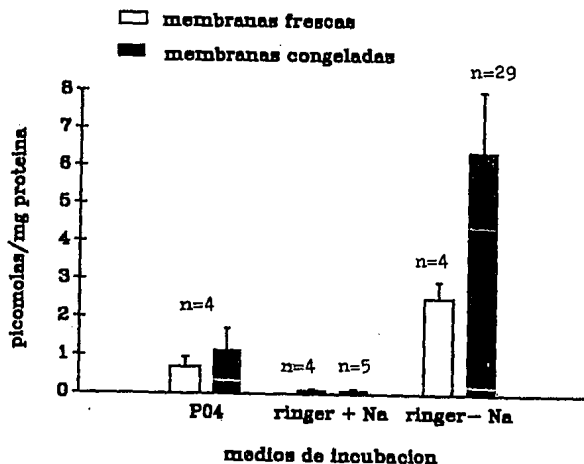


Figura 6.- Unión específica de glicina-³H a las membranas totales de la retina de la rana. Las membranas recién aisladas (frescas) o congeladas durante 1-5 días, se incubaron con 25 nM del radioactivo, en diferentes medios de incubación, durante 10 minutos, la incubación se detuvo por centrifugación y la unión específica se calculó con glicina 1 mM (ver Métodos); la unión siempre es mayor en las membranas congeladas, y se aumenta drásticamente con el uso de un ringer sin Na⁺, amortiguado con Tris-HCl 0.05 M.

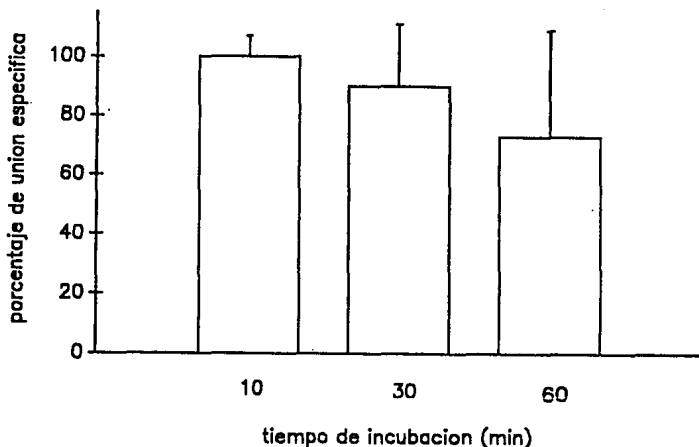


Figura 7.- Unión específica de glicina-³H 25 nM a las membranas totales de la retina de la rana. El tejido se aisló y se congeló durante 1-5 días antes de realizar los ensayos de unión, en éstos las membranas se incubaron en un ringer sin Na⁺ Tris-HCl en presencia del ligando radioactivo durante los tiempos indicados, la incubación se detuvo por centrifugación y la unión específica se calculó con glicina 1 mM. Se muestra el porcentaje \pm e.s. de 4 experimentos, tomando como referencia la unión obtenida en el mismo medio durante 10' de incubación (6.4 ± 1.6 pmolas/mg proteína, figura 6).

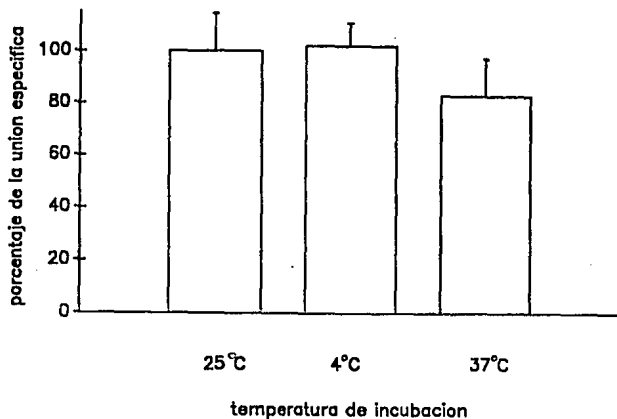


Figura 8.- Unión específica de glicina-³H 25 nM a las membranas totales de la retina de la rana. El tejido se aisló y se congeló durante 1-5 días antes de los ensayos de unión, que consistieron en la incubación en un medio ringer sin Na⁺ Tris-HCl, durante 10' a las temperaturas indicadas, la unión específica se calculó con glicina 1 mM. Los valores (promedio ± e.s., n=4) representan el porcentaje de la unión específica obtenida en el mismo medio, durante 10' de incubación a temperatura ambiente.

Unión de glicina-³H a las membranas sinaptosomales de la retina de la rana

La unión de glicina-³H se evaluó en el intervalo de concentraciones de 0-200 nM. En las membranas de la fracción enriquecida en sinaptosomas de la capa plexiforme externa (P1), la unión se saturó a 100 nM de glicina-³H, obteniéndose un valor máximo de unión de 3.06 pmolas/mg de proteína, con una $K_D = 12$ nM (figura 9).

En contraste, la unión específica de glicina-³H a las membranas de la fracción enriquecida en sinaptosomas de la capa plexiforme interna (P2), fue muy baja en concentraciones menores de 10 nM, a partir de la cual se activó súbitamente y alcanzó saturación a una concentración de 100 nM, obteniéndose una unión máxima de 2.7 pmolas/mg proteína (figura 10a).

La cinética sigmoide de la unión de glicina-³H en las membranas de P2 sugirió que el tejido conservaba una cantidad significativa del ligando natural, que interfería con la unión específica. Para explorar esta posibilidad, se introdujo en el método de aislamiento una incubación a 37°C, durante la cual las membranas se diluyeron 1:100 en Ringer Tris-HCl ("lavado", ver Métodos)

Bajo estas condiciones, las membranas de P2 presentaron una cinética de tipo hiperbólico, saturándose a 200 nM. El análisis de Scatchard reveló un solo componente, con $K_D = 82$ nM y $B_{max} = 3.65$ pmolas/mg proteína (figura 10b). Los parámetros cinéticos de la unión de glicina-³H a las membranas de P1 no se alteraron por este tratamiento (figura 9, comparar los trazos).

Debido a que este tratamiento facilitó el análisis cinético de la unión de glicina-³H en las membranas de P2, sin modificar los de la unión a las membranas de P1, las

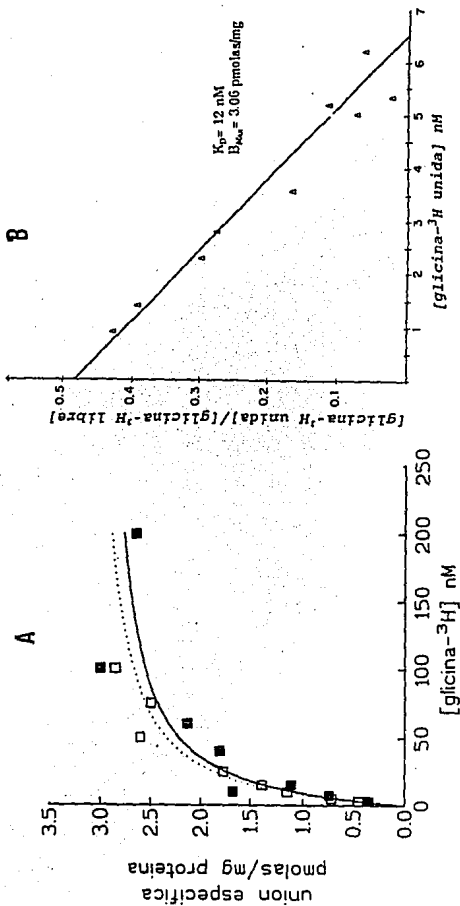


Figura 9.- Unión específica de glicina-³H a las membranas de la fracción sinaptosomal P1 de la retina de la rana. A) La unión específica dentro del intervalo de concentración 0-200 nM no se altera si las membranas son lavadas en exceso de ringer, a 37°C, durante su aislamiento (cuadros negros, ver Métodos), o si se aíslan sin recurrir a este tratamiento (cuadros blancos); la curva se trazó mediante un programa computacional (ver Métodos). B) El análisis gráfico de Rosenthal de los datos de las membranas "lavadas" en exceso de ringer, el ajuste se realizó por mínimos cuadrados ($r^2 = 0.977$), los puntos son el promedio de 3 experimentos realizados por triplicado, que no difirieron más del 10%.

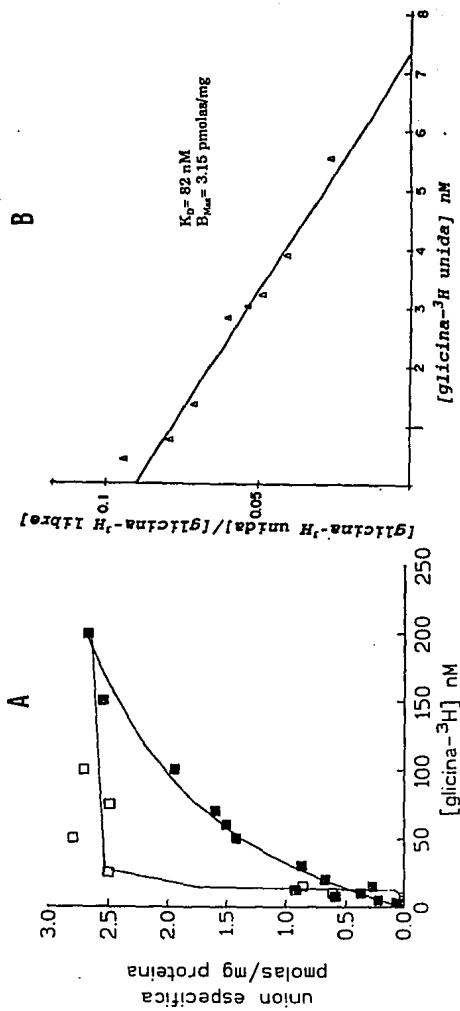


Figura 10.- Cinética de la unión de glicina-³H a las membranas de la fracción sinaptosomal P2 que se sometieron a la incubación a 37°C (cuadros negros) como se describe en los métodos. El tratamiento hizo posible detectar la unión específica a bajas concentraciones, comparada con la unión que se obtiene utilizando membranas sin el tratamiento (cuadros blancos), los trazos se realizaron con ayuda de un programa computacional (ver Métodos). B) El análisis gráfico de Rosenthal con los datos de las membranas tratadas, el ajuste se realizó por mínimos cuadrados $r^2 = 0.976$, los puntos son el promedio de tres experimentos realizados por triplicado, que no difirieron más del 10%.

membranas fueron tratadas de la misma forma para evaluar la farmacología de la unión de glicina-³H.

Desplazamiento de la unión de glicina-³H

El desplazamiento de esta unión específica se ensayó con base en el perfil farmacológico conocido para el RGly de la médula de la rata (Young y Snyder), de manera que se utilizaron como inhibidores de la unión (desplazadores) a los aminoácidos β-alanina, taurina, L-serina y GABA, la estricnina y su análogo estructural 2NH₂-estricnina; el esteroide RU 5135, que compite por el sitio de estricnina en el RGly (Ruiz-Gómez *et al*, 1989); la picrotoxina y la bicuculina, ambos antagonistas del receptor ionotrópico GABA_A, que es homólogo del RGly (Tapia, 1983). También se probaron los ácidos cis-aminocrotónico (ACAC) y trans-aminocrotónico (ATAC), que son análogos estructurales del GABA.

Para desplazar a la glicina-³H además se utilizaron la D-serina, el ácido kinurénico (Kyn), el ácido 7-cloro-kinurénico (7CK), el ácido 5,7 dicloro-kinurénico (5,7- DCK) y la 3-amino-1-hidroxi-pirrolidin-2-ona (HA966), moléculas de las que se tiene evidencia que interactúan con el sitio de glicina en el receptor tipo NMDA (NMDAr) de aminoácidos excitadores (Fletcher *et al*, 1990; Hurt y Baron, 1990).

La concentración del ligando radioactivo para los ensayos de desplazamiento fue de 2 nM; cada desplazador se probó a una concentración de 100 μM ó 1 mM. Cuando el desplazamiento de la unión específica fue mayor al 60%, se construyeron curvas de

desplazamiento con concentraciones del desplazador en el intervalo de 10 nM hasta 100 μ M.

El desplazamiento de la unión de glicina- ^3H por los compuestos antes mencionados se muestra en la tabla II. En ésta se observa que la β -alanina, la D-serina, la L-serina y el HA966 son efectivos desplazadores de la unión específica de glicina en ambas fracciones membranales. Sin embargo, la esticnina y el resto de las moléculas provocaron un desplazamiento pequeño y no en todos los casos de manera significativa.

En las membranas de P1 se observó un desplazamiento significativamente mayor logrado por la β -alanina y la L-serina en comparación con el resto de las drogas probadas ($p < 0.05$; *t* student); en cambio, en las membranas de P2 todas las drogas desplazaron el mismo porcentaje de la unión específica (tabla II).

Las curvas de desplazamiento de glicina- ^3H se construyeron con la β -alanina, la D-serina, la L-serina y el HA966, que se muestran en las figuras 11-14. En estas figuras se trazaron las curvas de desplazamiento con herramientas computacionales, como se describió en los Métodos, para calcular la dosis efectiva para desplazar el 50% de la unión específica (E_{50}). El número de moléculas que interactúan al realizarse este desplazamiento (n_H) se calculó por ajuste de mínimos cuadrados de las gráficas de la transformación logit, con coeficientes de correlación ($r^2 \geq 0.89$). Los parámetros obtenidos se muestran en la tabla III.

En la fracción P1, el desplazador más potente fue la L-serina, seguida en orden de

Tabla II.- Desplazamiento de la glicina-³H 2 nM en las fracciones membranales de la retina de la rana

Porcentaje de desplazamiento

Droga	P2	P1
Glicina 1 mM	100	100
β -alanina 1 mM	79 \pm 8 (3)	92 \pm 5 (5)*
Taurina 1 mM	12 \pm 7 (4)	36 \pm 20 (4)
PTX 100 μ M	9	0
GABA 1 mM	10 \pm 7 (3)	0
Stry 100 μ M	12 \pm 6 (10)	16 \pm 18 (8)
Bicu 100 μ M	0	0
Dser 100 μ M	75 \pm 8 (6)	64 \pm 4 (5)
Lser 100 μ M	72 \pm 9 (4)	96 \pm 2 (4)*
HA966 100 μ M	70 \pm 8 (6)	65 \pm 13 (4)
7CK 100 μ M	23 \pm 14 (3)	0
5,7,DCK 100 μ M	28 \pm 10 (4)	31 \pm 18 (4)
2NHstry 100 μ M	44 \pm 26 (3)	5 \pm 3 (4)
RU5135 100 μ M	0	42
ACAC 100 μ M	0	0
ATAC 100 μ M	0	0

Los datos son el promedio \pm e.s. de (n) experimentos ó el promedio de 2 experimentos, con respecto al desplazamiento logrado por glicina 1 mM (100%). *= desplazamiento significativamente mayor al logrado por el resto de las drogas (p<0.05; t student) Abreviaturas: PTX= picrotoxina; D y Lser= D-serina y L-serina; stry= estricnina; bicu= bicuculina; 7CK= 7-cloro-kinurenato; 5,7,DCK= 5,7 di- cloro kinurenato; 2NHstry= 2-amino - estricnina; ACAC= ácido cis- amino- crotónico; ATAC= ácido trans- amino-crotónico.

Desplazamiento de glicina- ^3H
por beta-alanina

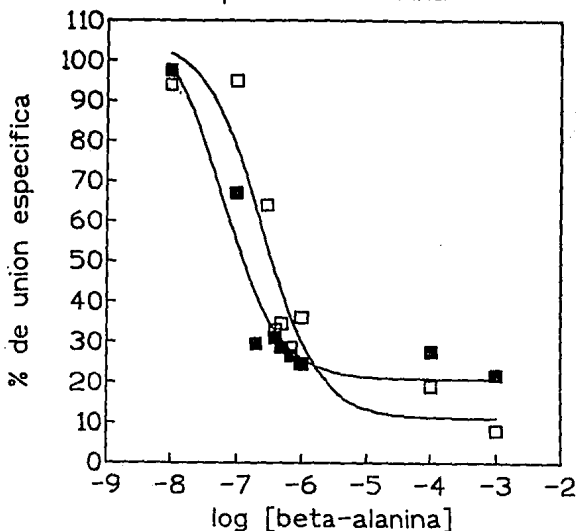


Figura 11.- Desplazamiento de la glicina- ^3H 2 nM por β -alanina en las membranas de las fracciones P1 y P2 de la retina de la rana. Los ensayos de desplazamiento se realizaron incubando las membranas de P1 (cuadros blancos) o de P2 (cuadros negros) en presencia del radioactivo y en paralelo con concentraciones crecientes de β -alanina. Los puntos representan el porcentaje de desplazamiento con respecto a la unión específica obtenida con glicina 1 mM, la curva se trazó con un programa computacional r^2 P1= 0.892, P2= 0.933, los puntos son el promedio de tres experimentos por duplicado que no difirieron más del 10%.

Desplazamiento de glicina- ^3H
por L-serina

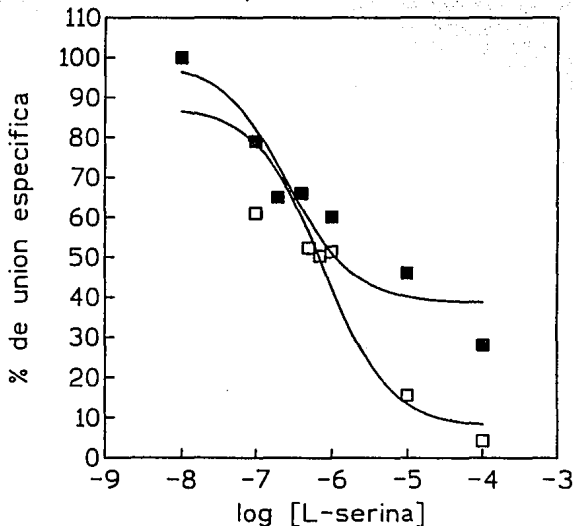


Figura 12.- Desplazamiento de la unión específica de glicina- ^3H 2 nM por L-serina en las membranas de las fracciones P1 (cuadros blancos) y P2 (cuadros negros). Los ensayos de desplazamiento se realizaron incubando las membranas en presencia del ligando radioactivo más concentraciones crecientes de L-serina, el desplazamiento representa un porcentaje de la unión específica obtenida con glicina 1 mM. Las curvas se trazaron como se indica en la figura 11, r^2 P1 y P2= 0.898, los puntos son el promedio de tres experimentos por duplicado que no difirieron más del 10%.

Desplazamiento de glicina- ^3H
por D-serina

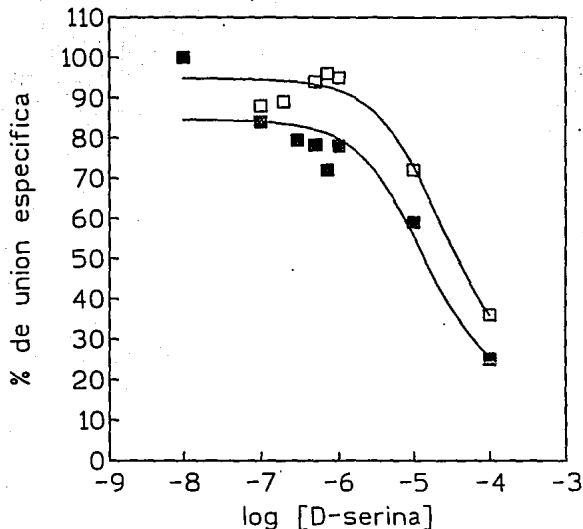


Figura 13.- Desplazamiento de la glicina- ^3H 2 nM por D-serina en las membranas de las fracciones P1 (cuadros blancos) y P2 (cuadros negros). Las condiciones experimentales y el trazo de la curva fueron iguales a como se describe en las figuras 11 y 12, r^2 P1= 0.962, P2= 0.894, los puntos son el promedio de tres experimentos por duplicado que no difirieron más del 10%.

Desplazamiento de glicina- ^3H
por HA966

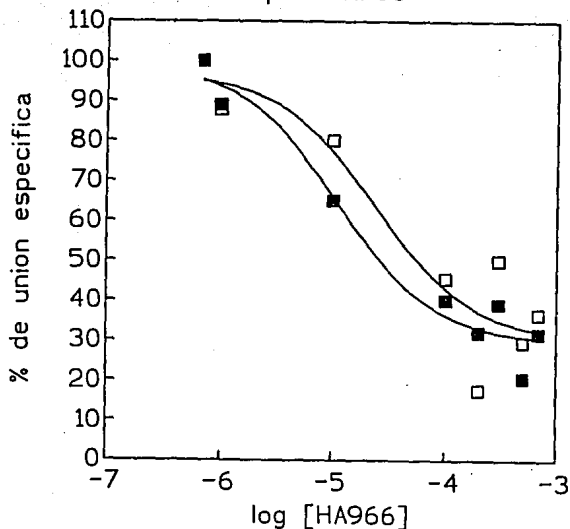


Figura 14.- Desplazamiento de glicina- ^3H 2 nM por el HA-966 en las membranas de las fracciones P1 (cuadros blancos) y P2 (cuadros negros). Las condiciones experimentales y el trazo de la curva fueron como en las figuras 11-13, r^2 P1= 0.884, P2= 0.963. Los puntos son el promedio de tres experimentos por duplicado que no difirieron más del 10%.

P2

P1

	n_H	E_{c50} μM	n_H	E_{c50} μM
β -ala	0.79	0.06	0.68	0.25
D-serina	0.85	12.8	1.05	23
L-serina	0.64	0.265	0.97	0.769
HA966	0.85	10.9	1.2	23.9

Tabla III.- Número de Hill (n_H) y concentración efectiva para desplazar el 50% (E_{c50}) de la unión específica de glicina-³H 2 nM en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana. Los valores de E_{c50} se calcularon de las figuras 11-14 y el n_H del ajuste por mínimos cuadrados de la transformación logit de cada una de estas curvas (ver Métodos), con $r^2 \geq 0.89$.

potencia por β -alanina > D-serina > HA966. El n_H , cercano a 1, indicó que la interacción entre la glicina- 3H y el desplazador es 1:1.

Para la fracción P2 el desplazador más potente resultó ser la β -alanina ($E_{CS0} = 0.06 \mu M$), seguida en orden de potencia por la L-serina > D-serina > HA966; el n_H en todos los casos fue menor que 1, lo que indicó que las moléculas interactúan 1:1.

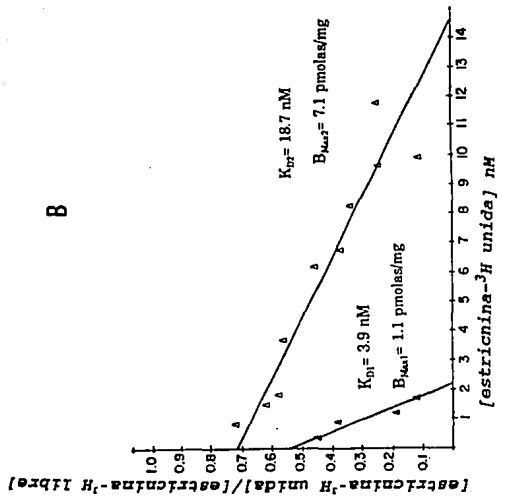
Unión de estricnina- 3H a las membranas sinaptosomales de la retina de la rana

La unión de estricnina- 3H presentó una cinética sigmoide en ambas fracciones membranales (figuras 15a y 16a). Como en el caso de la unión de glicina- 3H a las membranas de P2, la incubación de ambas fracciones a $37^\circ C$ ocasionó una modificación en la cinética de unión de estricnina- 3H .

Bajo estas condiciones, la unión de estricnina- 3H en las membranas de P1 es saturable. El análisis de Scatchard reveló la existencia de dos sitios de unión, ambos de alta afinidad. El primero mostró una $K_D = 3.9 \text{ nM}$ y una $B_{Max} = 1.1 \text{ pmolas/mg protefna}$; el segundo presentó $K_D = 18.7 \text{ nM}$ y $B_{Max} = 7.1 \text{ pmolas/mg protefna}$ (figura 15b).

Por otra parte, la unión de estricnina- 3H a las membranas de P2 también presentó una cinética del tipo de Michaelis-Menten (figura 16a). En este caso, lo mismo que para las membranas de P1, el análisis de Scatchard reveló la existencia de dos sistemas de alta afinidad: el primero con $K_D = 0.6 \text{ nM}$ y el segundo con $K_D = 48.1 \text{ nM}$; y $B_{Max} = 0.4 \text{ pmolas/mg protefna}$ y $4.5 \text{ pmolas/mg protefna}$, respectivamente (figura 16c).

Las gráficas de Rosenthal presentan, para estas cinéticas, dos líneas rectas que no



A

B

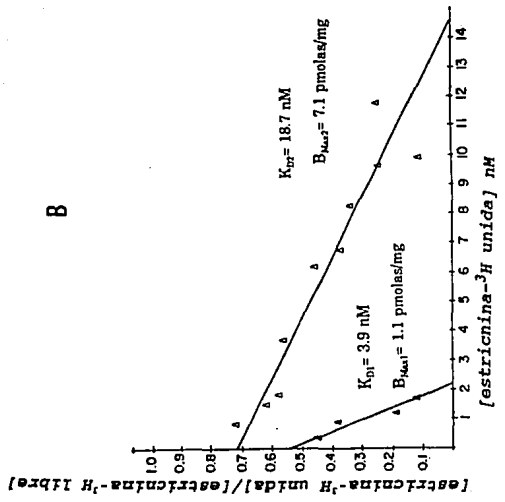


Figura 15.- A) Cinética de la unión de estricnina-³H a las membranas de PI, la unión específica se obtuvo con estricnina 100 μ M. Las fracciones membranales se aislaron con un lavado en exceso de ringer a 37°C (cuadros negros) o sin éste (cuadros blancos); el tratamiento permite que la cinética sea saturable y de forma hiperbólica, la curva se trazó mediante un programa computacional, $r_2^2 = 0.922$ (ver Métodos). B) Análisis de Rosenthal de la cinética de la unión de las fracciones membranales tratadas, el ajuste se realizó por mínimos cuadrados, nótese la presencia de 2 sitios de unión: $r_1^2 = 0.957$, $r_2^2 = 0.959$, los puntos son el promedio de tres experimentos en duplicado, que no difirieron más del 10%.

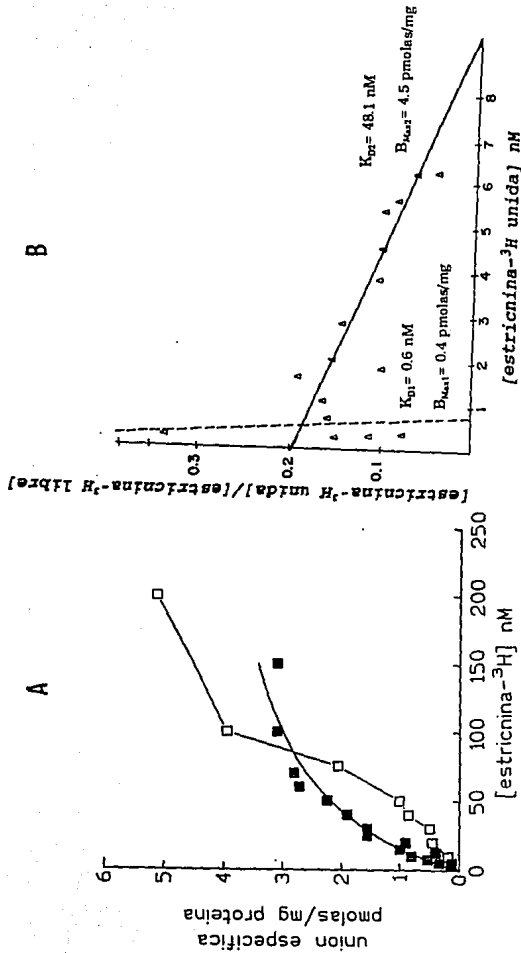


Figura 16.- A) Cinética de la unión de estricnina-³H a las membranas de P2, la unión específica se obtuvo con estricnina 100 μ M. Las fracciones membranales se trataron por incubación a 37°C en exceso de ringer, conforme se describe en los Métodos (cuadros negros), las membranas que no se trataron de esta manera presentaron una cinética no hiperbólica (cuadros blancos), las curvas se trazaron mediante un programa computacional (r^2 cuadros negros= 0.97). B) Análisis de Rosenthal de los datos obtenidos con las membranas tratadas, que revela la existencia de 2 sitios de unión, el ajuste se realizó por mínimos cuadrados: $r^2_1 = 0.894$, $r^2_2 = 0.954$, los datos son el promedio de tres experimentos por duplicado que no difirieron más del 10%.

se intersectan en el caso de las membranas de P1, y en el caso de las membranas de P2 hay una intersección, aunque las rectas no son continuas entre sí. Es más frecuente durante este análisis gráfico que la existencia de dos sitios se revele por rectas que son continuas entre sí, lo que señala que se trabaja con un receptor que pasa de un estado de alta afinidad a otro de baja afinidad, o que hay dos sitios independientes que difieren en su afinidad en un orden de magnitud. En nuestro caso, las rectas indican la existencia de dos sitios completamente independientes pero con afinidades semejantes en las membranas de P1; en las membranas de P2 estos sitios, además, presentan afinidades diferentes (Unnerstall, 1990).

Desplazamiento de la unión de estriquina-³H

El desplazamiento de la estriquina-³H se evaluó con las mismas moléculas que se utilizaron en el caso de la unión de glicina-³H con respecto a la farmacología del RGly de la médula espinal de la rata, y para descartar que el efecto de las moléculas propuestas como ligandos en el NMDAr fuera inespecífico.

Sólo la estriquina y su análogo estructural 2NH₂-estriquina desplazaron a la estriquina-³H de las membranas de ambas fracciones sinaptosomales. Del resto de las drogas evaluadas, el esteroide RU 5135 y la bicuculina desplazaron poco más que el 50% de la unión específica, pero sólo en las membranas de la fracción P2. Aparentemente, en las membranas de P2 la unión de estriquina-³H fue más susceptible de desplazarse,

Desplazamiento de estricnina-³H
por 2NH-estricnina

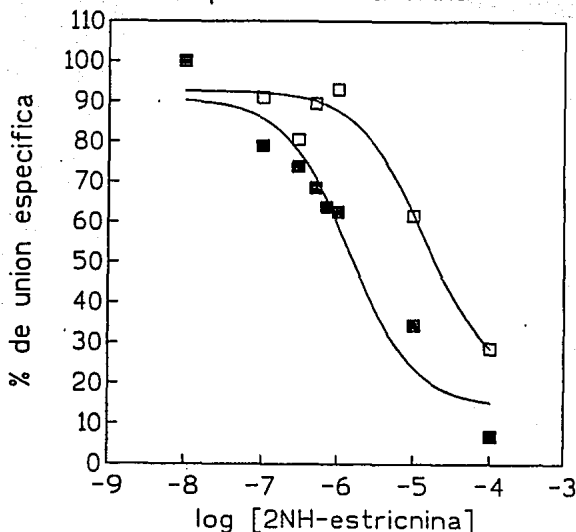


Figura 17.- Desplazamiento de la estricnina-³H de las membranas de P1 (cuadros blancos) y de P2 (cuadros negros) por la 2NH-estricnina. Las membranas se incubaron en presencia del ligando radioactivo y en paralelo con concentraciones crecientes de 2NH₂-estricnina, los valores son el porcentaje de desplazamiento con respecto a la unión específica obtenida con estricnina 100 μM, la curva se trazó mediante un programa computacional (ver Métodos) r²: P1= 0.947, P2= 0.938, los puntos son el promedio de tres experimentos por duplicado que no difirieron más del 10%.

puesto que la β -alanina y la taurina lograron desplazar casi el 50% de la unión específica; las diferencias fueron significativas estadísticamente ($p < 0.03$; t student, tabla IV).

En cambio, en las membranas de la fracción P1 el desplazamiento de estricnina- ^3H con cualquiera de los aminoácidos probados no sobrepasó el 20%; aun el desplazamiento con 2NH_2 -estricnina fue menor al observado en las membranas de P2 (72%), aunque esta droga desplazó significativamente mayor porcentaje de estricnina- ^3H que el resto de las evaluadas ($p < 0.04$; t student, tabla IV).

Las curvas de desplazamiento para la estricnina- ^3H se construyeron con la 2NH_2 -estricnina (figura 17) y con el esteroide RU 5135. La tabla V muestra la $E_{\text{C}_{50}}$ y el n_{H} calculado como en el desplazamiento de glicina- ^3H para cada desplazador. Dichos datos fueron consistentes para la 2NH_2 -estricnina en las dos fracciones membranales, y aunque en ambas el n_{H} resultó aproximado a 1, la $E_{\text{C}_{50}}$ fue muy alta con respecto a lo que se ha reportado en la literatura (Ruíz-Gómez *et al*, 1989).

En el caso del desplazamiento de estricnina- ^3H por RU 5135, el n_{H} en las membranas de P2 fue mucho menor a 1, lo que indica que no hay interacción de estas moléculas en una misma proteína, y esto se apoya por los valores de $E_{\text{C}_{50}}$. En las membranas de P1 el RU 5135 no desplazó a la estricnina- ^3H a un nivel en el que pudieran calcularse la $E_{\text{C}_{50}}$ ó el n_{H} , pese a que se utilizó una concentración de hasta $700 \mu\text{M}$ del desplazador.

Tabla IV.- Desplazamiento de la estricnina-³H
2 nM en las membranas sinaptosomales de la
retina de la rana.

Porcentaje de Desplazamiento

Droga	P2	P1
Stry 100 μ M	100	100
β -alanina	43 \pm 4 (9)**	12 \pm 5 (8)
Taurina	46 \pm 7 (7)**	17 \pm 6 (9)
PTX	7 \pm 3 (3)	9 \pm 2 (3)
GABA	9 \pm 4 (4)	5 \pm 3 (5)
Glicina	39 \pm 3 (3)	21 \pm 10 (12)
Bicuculina	50 \pm 11(4)	20 \pm 6 (4)
D-serina	12 \pm 7 (3)	7
L-serina	14	0
HA966	13	0
7-Cl-Kyn	17	18 \pm 6
2NH ₂ stry	93 \pm 8 (4)	72 \pm 10 (5)*
RU 5135	53 \pm 12(3)**	11 \pm 8 (4)
ACAC	0	0
ATAC	0	13

Se reporta el promedio \pm el error estándar de (n) experimentos, ó el promedio de 2 experimentos, con respecto al desplazamiento logrado por estricnina (stry) 100 μ M (100%).
* = desplazamiento significativamente mayor al logrado por el resto de las drogas en P1 (p<0.04; t student), ** = desplazamiento significativamente mayor al logrado por la misma droga en P1 (p<0.03; t student)
Abreviaturas como en la tabla II.

	P2		P1	
	E_{c50} μM	n_H	E_{c50} μM	n_H
2NH ₂ stry	1.4	0.83	13.6	0.88
RU 5135	14.9	0.25	n.d.	n.d.

Tabla V.- E_{c50} y n_H para el desplazamiento de la unión específica de estircina-³H 2 nM, los parámetros se calcularon de las curvas trazadas en la figura 15 (E_{c50}) y de la transformación logit de ésta (ver Métodos) con $r^2 \geq 0.94$.

DISCUSION

Unión de glicina-³H

La unión específica de glicina a las membranas de la retina de la rana es un proceso que alcanza el equilibrio rápidamente; es independiente de temperatura y de Na⁺, características que se han descrito como específicas de receptores membranales. El que no dependa de temperatura metabólica significa que no se trata de una unión a sistemas tales como los transportadores, los cuales si muestran dicha dependencia (Yamamura, 1990; Enna y Snyder, 1975). Por el contrario, la unión que observamos parece inhibirse en presencia de Na⁺ y de PO₄⁻; características que no se han reportado y que pueden ser importantes para conocer las condiciones iónicas que regulan al RGly.

Debido a la existencia de un sistema de transporte de alta afinidad para glicina, tanto en neuronas como en otro tipo de células (Marc, 1985), y dada la disponibilidad de la estricnina como el antagonista más potente y específico de los efectos neuronales de la glicina, la unión de glicina-³H para señalar a su receptor postsináptico (RGly) fue muy poco utilizada hasta la segunda mitad de los 1980's (Marc, 1985; Pourcho y Goebel, 1990). Sin embargo, desde la demostración de la interacción de la glicina con el receptor tipo NMDA (NMDAr) de aminoácidos excitadores (Johnson y Ascher, 1987), tomaron auge los estudios de unión específica de glicina-³H a las membranas sinaptosomales de diversas regiones del sistema nervioso central (SNC) (Fletcher *et al*, 1990; Cordi, 1990).

Aunque a la fecha son numerosos, los trabajos acerca de la unión específica de

glicina- ^3H no han profundizado en los efectos de la composición iónica del medio sobre esta unión, así como tampoco se conoce que disminuye a 37°C ni con tiempos largos de incubación, como encontramos en este estudio; por esto, nuestros hallazgos acerca de una menor cantidad de unión específica en estas condiciones señala una característica importante de la unión de glicina- ^3H que vale la pena explorar *in extenso*.

La unión de glicina- ^3H en ambas fracciones membranales, P1 -enriquecida en sinaptosomas de fotorreceptores- y P2 -enriquecida en sinaptosomas de la capa plexiforme interna (CPI)- resultó ser de alta afinidad, con K_D de 12 nM y de 82 nM, respectivamente. La afinidad y la capacidad en la unión de glicina- ^3H por las membranas sinaptosomales de la retina de la rana indica que se señala a un receptor y no a un sistema de captación, que existe en el sistema nervioso central (SNC) con una afinidad entre 5 y 10 μM (Marc, 1985), en la retina completa de la rana, la rata y el conejo -entre 10 a 20 μM (Voadon, 1976)- y en los sinaptosomas de la capa plexiforme externa (CPE) y de la CPI de la misma especie de rana que se utilizó en este trabajo (100 μM y 46.5 μM , Salceda, 1989).

Todas las consideraciones anteriores nos indican que, la unión de glicina- ^3H a las membranas sinaptosomales de la retina de la rana reportada en este estudio, señala la existencia de sitios de reconocimiento de este aminoácido independientes del sistema de transporte de alta afinidad, que corresponden a receptores membranales involucrados en la comunicación neuronal.

En varias regiones del SNC, el lavado extensivo de las membranas antes de los ensayos de unión elimina la interferencia de los ligandos endógenos (Yamamura, 1990; Enna y Snyder, 1978) y facilita el análisis matemático de la unión específica. En nuestra preparación sólo ocurre este fenómeno, ya que la cinética de la unión de glicina-³H a las membranas sinaptosomales de P1 es la misma independientemente de la incubación en exceso de Ringer Tris-HCl (figura 9a, Resultados); si se hubiera producido una modificación sobre la proteína que une a la glicina-³H, la cual pudiera explicar la modificación de la cinética en la unión a las membranas de P2, también debería haberse modificado la cinética en las membranas de P1 que se sometieron al mismo tratamiento. No obstante, existe evidencia electrofisiológica de que, la respuesta del RGly a la glicina y otros agonistas, presenta una cinética sigmoide.

La afinidad por la glicina-³H y la capacidad del sistema de unión en cada una de las fracciones membranales presentan valores semejantes a los que se han obtenido en la médula espinal y la médula oblongada de la rata, con K_D entre 40 a 200 nM (Kishimoto *et al*, 1981, Marvizón *et al*, 1989), así como en la corteza cerebral del ratón (Saransaari y Oja, 1992) y de la rata (Kessler *et al*, 1989; Theding *et al*, 1989; Leeson *et al*, 1992), con constantes de afinidad de 100 a 200 nM. Asimismo, la afinidad en las membranas de P1 (12 nM) está cerca de la K_D reportada para la unión de estircinina-³H en las membranas sinaptosomales de la médula espinal y del cerebro de la rana (11 nM y 16 nM, respectivamente; Müller y Snyder, 1978). Sin embargo, la $K_D= 82$ nM calculada en la unión de glicina-³H a las membranas de P2 está más cercana a los valores encontrados en la unión de glicina-³H insensible a estircinina en el NMDAr (Kishimoto *et*

al, 1981; Marvizón *et al*, 1989; Saransaari y Oja, 1992; Kessler *et al*, 1989; Theding *et al*, 1989; Leeson *et al*, 1992). Esto es interesante, puesto que se sugiere que la glicina-³H se une, en las membranas de P1, al RGly postsináptico típico. La idea se fortalece conforme se revisa la farmacología en el desplazamiento de glicina-³H, como se discute más adelante.

Desplazamiento de la unión de glicina-³H de las membranas sinaptosomales de la retina de la rana

El desplazamiento de la unión de glicina-³H de las membranas sinaptosomales de la retina de la rana apoya la idea de la existencia de receptores membranales para este aminoácido, independientes del sistema de transporte de alta afinidad. La razón estriba en que la β-alanina y la L-serina, ambos efectivos inhibidores de la unión (desplazadores) de glicina-³H, como se muestra en este estudio (tabla II), no inhiben el transporte de alta afinidad de glicina por los sinaptosomas de la retina de la rana (Salceda, 1989), como tampoco el transporte de alta afinidad en la médula espinal de los mamíferos (Marc, 1985) ni en la retina completa del pez dorado (Chin y Lam, 1980).

Sin embargo, el perfil farmacológico de la unión de glicina-³H en las fracciones membranales (tabla II) no es inequívoco con respecto al tipo de receptores que se señalan. En la tabla II puede apreciarse que, para las membranas de P1, los desplazadores más efectivos son, significativamente, la β-alanina y la L-serina ($p < 0.05$, *t* student), seguidas por la D-serina y el HA966; la misma situación que se guarda para

las membranas de P2. De inmediato, la insensibilidad de la unión de glicina-³H al desplazamiento por estricnina salta como la característica más notable.

Los sitios de unión glicina-³H insensibles a estricnina se reportaron primero para la médula espinal y para la corteza de la rata, por Kishimoto y sus colaboradores (1981). Al demostrarse la interacción glutámico/glicina en el NMDAr (Johnson y Ascher, 1987) se explicó la existencia de dichos sitios de unión y comenzó a caracterizarse desde los puntos de vista bioquímico y farmacológico (Kessler *et al*, 1989; Fletcher *et al*, 1990; Kemp y Leeson, 1993). En la retina del pollo se han caracterizado estos sitios de unión y se ha demostrado su asociación con el NMDAr (Boje *et al*, 1992), pero estos resultados han sido los únicos referentes a la retina.

La insensibilidad de la unión de glicina-³H a estricnina en ambas fracciones membranales de la retina de la rana, y las E_{50} observadas en el desplazamiento de la glicina-³H por la D-serina --el agonista más potente de glicina en el NMDAr- y por el HA966 -el agonista parcial mejor caracterizado (Fletcher *et al*, 1990; Kemp y Leeson, 1993)- sugieren que la unión de glicina-³H a las membranas sinaptosomales de la retina de la rana está señalando un sitio de glicina semejante al del NMDAr.

Sin embargo, el 7-cloro-kinurenato (7CK), que por desplazamiento de la unión de glicina-³H y por antagonismo de las respuestas electrofisiológicas provocadas por NMDA/glicina (Kemp, *et al*, 1988), se ha demostrado como uno de los antagonistas más potentes del sitio de glicina en el NMDAr, no logró desplazar significativamente a la glicina-³H de las membranas sinaptosomales de la retina de la rana (tabla II). Existe una situación similar en el caso del 5,7 dicloro- kinurenato (5,7- DCK), el cual se ha propuesto

como un ligando potente y específico del sitio de glicina-³H en el NMDAr, con base en la unión de la molécula radioactiva y del desplazamiento de la unión específica de glicina-³H (Hurt y Baron, 1990).

En este punto, es importante reseñar los resultados obtenidos por Saransaari y Oja (1992) quienes midieron la unión de glicina-³H, insensible a estricnina, en las membranas sinaptosomales de la corteza cerebral del ratón. En esta preparación encontraron que la glicina-³H se desplazó por la β-alanina y la unión de β-alanina-³H se inhibió por glicina y por NMDA, pero no por estricnina. Estos resultados sugirieron la posibilidad de que la β-alanina interactuase en el mismo sitio que lo hace la glicina dentro del NMDAr.

Por otra parte, Boje y sus colaboradores (1992) midieron la unión de glicina-³H y del ácido amino -ciclo -propano -carboxílico-³H (ACPC), un agonista del sitio de glicina en el NMDAr, a las membranas totales de la retina del pollo; encontrando afinidades semejantes ($K_D = 271$ y 247 nM, respectivamente). Además la glicina y el ACPC aumentaron la unión de un inhibidor del canal iónico del NMDAr, la dizocilpina (MK-801), y protegieron contra la citotoxicidad inducida por la aplicación de NMDA. El resultado sugirió que, aunque en la retina del embrión de pollo pudieran detectarse sitios de unión de glicina insensibles a estricnina, aparentemente asociados al NMDAr, estos sitios no aumentan los efectos del NMDA, es decir, no se comportan como co-agonistas del NMDA.

El conjunto de datos expuestos en los dos párrafos anteriores sugiere que puede haber sitios de glicina asociados al NMDAr que ejerzan acciones diferentes en distintos subtipos de este complejo canal iónico-receptor, una idea que ha sido expuesta con

anterioridad (Thomson, 1990); o bien que el sitio mismo de glicina en el NMDAr presente perfiles farmacológicos particulares en los diversos subtipos del NMDAr.

Si consideramos esta última posibilidad, el desplazamiento de la unión de glicina-³H en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana refleja la co-existencia del RGly postsináptico típico y el sitio de glicina en el NMDAr. En la tabla II se aprecia que las moléculas que desplazan a la glicina-³H con mayor efectividad en las membranas de P1 son la L-serina y la β -alanina (significativo estadísticamente: $p < 0.05$, *t* student). Estos dos aminoácidos son efectivos inhibidores de la unión de estricnina-³H, tanto en las membranas sinaptosomales de la médula espinal de los mamíferos (Young y Snyder, 1973), en las membranas de la corteza cerebral de la rana (Müller y Snyder, 1978) y en las membranas de la retina del bovino (Borbe *et al*, 1981), además de que desensibilizan las corrientes de Cl⁻ provocadas por la aplicación de glicina en las neuronas talámicas del embrión de la rata (Tokutomi *et al*, 1989).

La correlación de estos datos con nuestros resultados indica que, en las membranas de P1, el desplazamiento de glicina-³H por β -alanina y L-serina se logra por la interacción sobre el RGly postsináptico. En la tabla III se aprecia que la β -alanina y la L-serina desplazan a la glicina a concentraciones submicromolares (0.251 μ M para β -alanina y 0.77 μ M para L-serina), lo que indica una alta afinidad por el sitio, semejante al desplazamiento de estricnina-³H en las preparaciones ya mencionadas. En los datos electrofisiológicos, que indican también la afinidad por el sitio de reconocimiento del agonista en el RGly, la β -alanina y la L-serina siguen en potencia a la glicina (Tokutomi *et al*, 1989). En las membranas de la retina de la rana, pese a que la unión de glicina-³H

no se modifica por estricnina, la interacción sobre el RGly puede explicarse por la existencia de variantes de la subunidades de este receptor postsináptico que sean resistentes a estricnina (Betz, 1991; Langosch *et al*, 1990) pero que conservan la alta afinidad por los agonistas. La distribución de estas subunidades durante el desarrollo es un evento normal, tanto en la médula espinal de los ratones (Langosch *et al*, 1990) como en el encéfalo de la rata (Becker *et al*, 1993).

En las tablas II y III puede apreciarse que, en las membranas de P1, la D-serina y el HA966 desplazan a la glicina-³H en un 64% y 65%, con E_{c50} mucho más altas que las de la β -alanina y la L-serina, pero que se parecen a los valores para el desplazamiento de la glicina-³H del NMDAr (Kemp y Leeson, 1993). Estos resultados son congruentes con las respuestas electrofisiológicas provocadas por glicina en el RGly, en donde la D-serina es el α -aminoácido menos potente en provocar la desensibilización cruzada (Tokutomi *et al*, 1989).

Estas consideraciones nos permiten proponer que, la unión de glicina-³H a las membranas sinaptosomales de P1 en la retina de la rana, permite distinguir la existencia de dos sitios donde la glicina lleva a cabo funciones de comunicación neuronal: el RGly postsináptico y el sitio asociado al NMDAr; este último con una farmacología atípica puesto que no responde a dos de los antagonistas más potentes, el 7CK y el 5,7DCK.

En las membranas de P2 la β -alanina, la L-serina, la D-serina y el HA966 desplazan con la misma efectividad a la glicina-³H (79%, 72%, 75% y 70%; tabla II). De entre estas moléculas, la β -alanina es la más potente, con E_{c50} = 0.06 μ M, semejante a la calculada

en el desplazamiento de glicina-³H en las membranas de P1. La L-serina y la D-serina presentan valores de E_{C50} , 0.256 μ M y 12.8 μ M; el HA966 tiene un valor de 10.9 μ M (tabla III).

En las membranas de P2 la sensibilidad a la β -alanina se conserva igual, pero el porcentaje de la unión específica que logra desplazar la L-serina (72%) es menor que en las membranas de P1 (96%), con una E_{C50} que se encuentra en el intervalo de potencia que presenta la L-serina para desplazar a la estircina-³H (Young y Snyder, 1973; Müller y Snyder, 1978) y para desensibilizar las respuestas electrofisiológicas a la glicina (Tokutomi *et al*, 1989).

Por su parte, la D-serina presentó una E_{C50} menor en las membranas de P2 que en las de P1; la E_{C50} del HA966 se redujo a menos de la mitad en la fracción P2. Esto significa que ambas moléculas aumentan su afinidad por el sitio de glicina-³H en las membranas de P2, y que los valores entre los parámetros sean tan parecidos indica que están uniéndose al mismo sitio.

Así, el perfil farmacológico del desplazamiento en las membranas de P2 resulta semejante al obtenido para las membranas de P1; lo que reproduce la co-existencia del RGly típico con otro sitio de unión de alta afinidad de glicina, probablemente asociado al NMDAr.

Sin embargo, en las membranas de P2 los sitios de unión de glicina-³H asociados al NMDAr parecen ser más abundantes que los del RGly, ya que se observa una menor afinidad en la unión ($K_D = 82$ nM en P2), así como una menor efectividad de la L-serina para desplazar a la glicina-³H junto con un aumento en la potencia de la D-serina y del

HA966.

Si se considera que la β -alanina puede actuar tanto en el sitio de glicina en el NMDAR (Saransaari y Oja, 1992), como en el RGly, en el caso de que co-existan estos complejos proteicos en ambas fracciones membranales de la retina de la rana, su afinidad por β -alanina es la misma. Si este es el caso, el RGly parece ser insensible a estricnina en la retina de la rana.

Unión de estricnina-³H

La unión de estricnina-³H a las fracciones membranales de P1 y de P2 de la retina de la rana presentó una cinética de tipo sigmoide, la cual se modificó hacia una de tipo hiperbólico cuando las membranas se incubaron a 37°C. Esta modificación apoyó la idea de que las fracciones membranales conservaban una alta concentración de una molécula endógena que interfirió con la unión de bajas concentraciones de estricnina-³H y de glicina-³H.

La unión de estricnina-³H ha sido estudiada de manera preferente sobre la de glicina-³H para caracterizar al RGly, ya que es el antagonista más específico y potente de la acción de la glicina sobre las neuronas.

El análisis de Rosenthal de la unión de estricnina-³H a las membranas sinaptosomales de P1 y de P2 reveló dos sitios de alta afinidad. Aun cuando la forma

de nuestras gráficas no es parecida a lo que se encuentra con frecuencia en los estudios de unión específica, se sabe que los sitios de unión independientes presentan esta apariencia (Unnerstall, 1990).

En las membranas de P1 el primer sitio presenta $K_D = 3.9$ nM y el segundo $K_D = 18.7$ nM; en las membranas de P2 las constantes respectivas fueron de 0.6 nM y 48 nM. Estos valores son semejantes a las constantes de afinidad encontradas en la unión de estircina- ^3H en el RGly purificado de la médula espinal de la rata (Ruíz-Gómez *et al*, 1990), en las membranas sinaptosomales de la médula espinal de la rana (Müller y Snyder, 1978), en las membranas totales de la retina de la rata (Schaeffer y Anderson, 1980) y de la retina del bovino (Borbe *et al*, 1981).

Aun cuando las constantes de afinidad son semejantes a los valores conocidos, en ninguno de los trabajos mencionados se encontraron dos sitios de unión de estircina- ^3H ; aunque durante la interacción de la glicina para desplazar a la estircina- ^3H y la activación de la corriente de Cl^- en el RGly requieren de dos moléculas del aminoácido (Young y Snyder, 1974a; Tokutomi *et al*, 1989). Estos datos indican que el RGly presenta dos sitios de reconocimiento del agonista, pero no del antagonista.

Por otra parte, los estudios bioquímicos con el RGly purificado de la médula espinal de la rata han demostrado que, aunque la glicina y la estircina se unen a la subunidad de 48 kDa (α) y en el complejo propuesto hay 3 monómeros de ésta (Langosch *et al*, 1990), hay siempre un solo sitio de unión de estircina (Ruíz-Gómez *et al*, 1989, 1990 y 1991).

El análisis genético de las variantes de la subunidad α ha demostrado que los tipos α_1 , α_2 y α_3 son sensibles a estricnina; pero que la variante α_2^* es completamente insensible a este alcaloide (Kuhse *et al*, 1990; Betz, 1991). La expresión *in vitro* de estas subunidades ha demostrado que la composición homogénea, es decir, de un solo tipo de variante, produce complejos con propiedades distintivas a los de composición heterogénea. De esta manera, Schmieden y sus colaboradores (1992) reportaron que los complejos homogéneos de α , son muy sensibles a la activación por β -alanina y taurina y al antagonismo por estricnina; que los complejos α_2 disminuyen su afinidad por las tres moléculas mencionadas, pero que la expresión heteróloga α_1/α_2 reduce la sensibilidad a los agonistas sin modificar la que presentan por la estricnina.

La co-expresión de estas variantes con la subunidad de 93 kDa -gefrina- en los ovocitos de *Xenopus*, aumentó la $E_{C_{50}}$ de la estricnina para bloquear las corrientes de Cl⁻ (Takagi *et al*, 1992); pero ni esta manipulación, ni las anteriores, ha provocado la expresión de más de un sitio de unión de estricnina.

Lo anterior significa que los dos sitios de unión de estricnina-³ en las fracciones membranales de la retina de la rana podrían explicarse por la presencia de una subunidad, ausente en otras preparaciones, que constituye un subtipo del RGly que presenta dos sitios de unión a estricnina, con diferentes afinidades. Otra posibilidad es que el ensamblamiento de las variantes conocidas de las subunidades del receptor, dentro de la retina de la rana, produzcan complejos con más de un sitio de unión.

Una explicación alternativa a la presencia de dos sitios de unión de estricnina-³H en nuestra preparación radica es que, además del RGly típico, en la retina de la rana se

presente un canal de Cl⁻ sensible a estriquina. Muchas de las toxinas conocidas ejercen su efecto por el bloqueo de algún tipo de canal iónico, como la tetrodotoxina (TTX) con los canales de Na⁺ activados por voltaje, ó la omega-conotoxina con los canales de Ca⁺, con afinidades de unión en concentraciones nanomolares.

La posibilidad de que en la retina de la rana se localicen formas particulares del RGly no carece de fundamento. Justo a partir de la retina se han aislado ARN mensajeros que se traducen en complejos receptor-canal iónico, que presentan la activación de una corriente de Cl⁻ por GABA y por muscimol y la inhibición de ésta por picrotoxina, pero que no son inhibidos por bicuculina ni baclofen, los antagonistas arquetípicos de los tipos de receptores GABA_A y GABA_B, respectivamente (Polenzani *et al*, 1991). Con respecto a esta forma atípica del receptor de GABA, que se ha denominado como GABA_C (Shimada *et al*, 1992), se conoce la secuencia del gene (GABA_C, Cutting *et al*, 1991) y se sabe qué tipo de neuronas retinianas lo expresan *in situ*. Entre ellas se encuentran las células bipolares (B) de la rata (Feigenspan *et al*, 1993) y las células horizontales de bastones de la retina de la perca (Qian y Dowling, 1993).

Aunque en el caso del receptor tipo GABA_C se presenta la insensibilidad a los antagonistas, puede ocurrir que en la retina de la rana el RGly manifieste una afinidad por el antagonista (estriquina), tan alta que impida su desplazamiento por los

No existe evidencia de la interacción de la estriquina con otra proteína que no sea alguna de las que constituyen el complejo del RGly, excepto la interacción que presenta en algunos casos con el receptor GABA_A (Lewis y Faber, 1993). En este sentido, este

trabajo presenta datos novedosos acerca de la existencia de una nueva proteína dentro de la retina de la rana.

Desplazamiento de estricnina-³H

La 2-NH₂-estricnina (2NH₂-stry), el análogo estructural de la estricnina, fue la única molécula efectiva en desplazar a la estricnina-³H en las fracciones membranales P1 y P2 (93% en P2, 72% en P1). Del resto de las moléculas probadas, ninguna desplazó la unión específica en las membranas de P1 ($p < 0.04$, *t* student; tabla IV).

Como en el caso de la unión de glicina-³H, la inhibición de la unión de estricnina-³H sugiere diferencias importantes en cuanto a las proteínas involucradas. En la tabla IV se aprecia que la β -alanina, la taurina y la glicina inhibieron en un 40% esta unión específica en las membranas de P2, lo que es significativamente mayor que en las membranas de P1, y el caso es el mismo para la bicuculina y el RU 5135 ($p < 0.03$, *t* student). Si correlacionamos estos valores con los parámetros cinéticos de la unión de estricnina-³H (fig. 16), se observa que la mayor sensibilidad de la estricnina-³H al desplazamiento se presenta en la fracción membranas en donde se localiza el sitio de mayor afinidad, pero también con la menor capacidad ($K_{D1} = 0.6$ nM, $B_{Max1} = 0.4$ pmolas/mg proteína). Así, durante los ensayos de desplazamiento -con 2 nM de concentración del radioactivo- la ocupación de los sitios de mayor afinidad por la estricnina-³H pudo saturarlo, dejando libres el resto que, al presentar menor afinidad ($K_{D2} = 48$ nM) pudieron ser ocupados por los desplazadores, reduciendo la unión específica.

En las membranas de P1 se determinó una afinidad menor para los sitios de unión de estricnina-³H (K_{D1} = 3.9 nM, K_{D2} = 18.7 nM), pero, en combinación, una mayor capacidad de unión de estricnina-³H: B_{Max1} = 1.1 pmolas/mg proteína, B_{Max2} = 7.1 pmolas/mg proteína. Esta capacidad mayor para unir estricnina-³H, de dos sistemas concurrentes de alta afinidad, explica por qué la estricnina-³H es menos susceptible de desplazarse de las membranas de P1.

Desde luego, para que esta explicación tenga solidez, uno de los sitios de estricnina-³H debe formar parte del RGly típico.

En la tabla V se muestra el n_H y la E_{C50} calculados para el desplazamiento de estricnina-³H por la 2NH₂-stry. El valor del n_H , igual a 0.88 en P1 y 0.83 en P2, refleja la interacción 1:1 entre el ligando radioactivo y su desplazador; de forma semejante a lo que se ha obtenido para el RGly aislado de la médula espinal de la rata (Marvizón *et al*, 1986). El dato indica que esta interacción en las fracciones membranales de la retina de la rana ocurre sobre un mismo sitio, el que reconoce las características que comparten la estricnina y la 2NH₂-stry, como pueden ser los 5 anillos cíclicos que comparten las moléculas, o el átomo de oxígeno con una gran carga negativa, por poseer dos pares de electrones sin aparear, entre los anillos 4 y 5 de las moléculas (Tedeschi *et al*, 1968; Aprison, 1990).

Sin embargo, la E_{C50} calculada en el desplazamiento de estricnina-³H por 2NH₂-stry, en ambas fracciones membranales, es un orden de magnitud mayor con respecto a la reportada (11 nM y 30 nM, Marvizón *et al*, 1986; Ruíz-Gómez *et al*, 1989), lo que apoya la idea de que existe otra proteína que une estricnina, además del RGly típico; o que en

la retina de la rana éste tiene un perfil farmacológico diferente.

La misma tabla V muestra los valores correspondientes de n_H y E_{c50} para el desplazamiento de estriquina por el RU 5135. El esteroide fue sintetizado para interactuar con el sitio de reconocimiento del GABA en el receptor GABA_A, sin embargo también se conoce el hecho de que desplaza a la estriquina-³H del RGly (Ruíz-Gómez *et al*, 1989). Los valores obtenidos en nuestro estudio demuestran que el RU 5135 y la estriquina-³H no interactúan con la misma molécula (P1 $n_H = 0.25$, en P2 no pudo ser determinado) y se suman a las evidencias anteriores de la existencia de otro sitio de unión de estriquina-³H diferente del RGly, o de otro tipo de estructura de este complejo en la retina de la rana.

El desplazamiento de la estriquina logrado por la bicuculina en las membranas de P2 -parcial pero significativo en comparación con el obtenido en P1, $p < 0.04$, tabla IV- nos inclina a pensar que en esta fracción membranal hay una población de sitios de unión que corresponden al RGly, puesto que las respuestas electrofisiológicas provocadas por la glicina y mediadas por el RGly, pueden ser parcialmente ocluidas por la bicuculina en neuronas de la retina (Priest *et al*, 1985), de la médula espinal (Lewis y Faber, 1993) y del encéfalo (Safronov, 1989).

La relevancia de nuestros datos radica en que la estriquina-³H es desplazada sólo parcialmente por las moléculas que son agonistas del RGly típico. Esto asocia la unión específica de estriquina-³H con otra proteína que no forma parte de este receptor, a menos que en la retina de la rana este mismo presente un perfil farmacológico

completamente diferente al observado en otras regiones del SNC.

El papel de la glicina en la retina de la rana

Las investigaciones concierne al papel de la glicina en la retina de los vertebrados han puesto en claro que, dentro de la retina de los ectotermos, la glicina puede estar participando en ambas capas plexiformes; mientras que en los mamíferos su actividad se restringe a la capa plexiforme interna (CPI).

En peces y anfibios se ha visto que la glicina ejerce una acción inhibitoria tónica sobre las células horizontales (H), siendo las células interplexiformes (IP) quienes liberan a aquella (Borges y Wilson, 1991). Por otra parte, también existe el dato de que la glicina despolariza a las H (Borges y Wilson 1991); efecto que se explica por la acción de la glicina sobre la sinapsis del fotorreceptor (Ph)-H.

Los efectos duales de la glicina se atribuyen, en estos casos, a la existencia de distintos potenciales de equilibrio para el cloro (E_{Cl}) (Miller y Dacheux, 1983); pero, hasta la fecha, no se han investigado cuales son los mecanismos que permiten establecer distintos E_{Cl} en neuronas adyacentes. Quizá la respuesta subyazca en la presencia de un intercambiador aniónico que permita la distribución diferencial de los iones de Cl^- de acuerdo con las neuronas retinianas que lo presentan.

Si este fuera el caso, podríamos explicar la existencia de dos sitios de unión de estricnina- 3H y la insensibilidad de uno de ellos al desplazamiento por glicina, en la retina de la rana.

Existe suficiente evidencia para considerar al glutamato como el transmisor de los fotorreceptores (Marc, 1985, 1986; Wässle y Boycott, 1991) y se tienen evidencias electrofisiológicas de que actúa a través de receptores membranales del AMPA/Kainato (AMPA/KA) en las H (Zhou *et al*, 1993) y del tipo del ácido aminofosfonobutírico (APB) en las células bipolares de bastones (RB) (Yamashita y Wässle, 1991). Dentro la CPI, las respuestas electrofisiológicas que involucran a los receptores de glutamato tipo AMPA/KA se extienden a las células amacrinas (A) (Cubells *et al*, 1991) y las ganglionares (G) (Boos *et al*, 1993). En cambio, los datos de este tipo que involucren al receptor del tipo N-metil-D-aspartato (NMDAr) en la retina sólo se han colectado en las H de la retina del pez-gato (O'Dell y Christenson, 1989) y en las G del pez dorado (Yazejian y Fain, 1992), por lo que no se cree probable que la acción del glutamato sobre las neuronas retinianas ocurra a través del NMDAr.

Otros datos al respecto son los de Boje y sus colaboradores (1992), quienes recabaron los datos de unión específica de glicina-³H, insensible a estricnina, en las membranas totales de la retina del embrión de pollo. Como la unión específica fue sensible al ACPC, se asoció con el sitio de glicina en el NMDAr; sin embargo, la citotoxicidad inducida por NMDA fue atenuada por la aplicación conjunta con glicina, o con ACPC, un dato contrario al papel de co-agonista del NMDA que la glicina debe jugar dentro del receptor.

De tal manera que, los datos experimentales que sirvan de base para apoyar la existencia del NMDAr y su modulación por glicina dentro de la retina de los vertebrados, no son definitivos. No obstante, la comunicación neuronal intra-retiniana mediada por el

glutamato a través del NMDAr no puede dejar de ser considerada; de hecho, el co-agonismo glutamato-glicina en este receptor, explicaría la localización inmunocitoquímica de estos aminoácidos sobre las mismas B (Pourcho y Goebel, 1990).

El conjunto actual de datos referentes a la participación de la glicina en la retina, sugiere que ésta puede llevar a cabo al menos dos tipos de interacción entre las neuronas retinianas: una mediada por el RGly típico sensible a estricnina y otra mediada por el NMDAr, como co-agonista del glutamato. La serie de datos que hemos colectado, mediante los ensayos de unión específica, favorecen la idea de que así ocurre en ambas capas plexiformes de la retina de la rana.

El trabajo realizado plantea una nueva interrogante: ¿a qué sitio se une la estricnina-³H con tan alta afinidad y especificidad?. Sólo se encontró una molécula que inhibiera significativamente la unión específica de este alcaloide: la 2NH₂-stry. Esta, como análogo estructural de la estricnina, se ha utilizado tanto para purificar al RGly (Pfeiffer *et al*, 1982) como para evaluar la unión específica de estricnina-³H en otras regiones del SNC (Marvizón *et al*, 1986; Ruíz-Gómez *et al*, 1989, 1990).

En nuestro caso, el desplazamiento por 2NH₂-stry reforzó la idea de la presencia del RGly, conforme se reprodujeron los datos citados arriba; pero la insensibilidad de la unión de estricnina-³H a la glicina, a la β-alanina y a la taurina sugieren que hay un sitio, aparte del receptor, que reconoce las características estructurales y de localización de carga de la molécula de estricnina -conforme se discutió anteriormente-. La cuestión es dilucidar si esa existencia es factible y si es relevante para la comunicación neuronal

intra-retiniana.

Dentro de la capa plexiforme externa (CPE) la glicina puede ser el neurotransmisor de las células IP que actúe sobre las H y sobre los mismos Ph. Existen evidencias inmunocitoquímicas de la presencia del RGly en la CPE de *Xenopus* (Smiley y Yazulla, 1990) y de varias especies de mamíferos (Grünert y Wässle, 1993). En estos estudios no se ha discernido claramente el tipo de sinapsis en el que se localiza el RGly, aunque se ha sugerido que las membranas sobre las que se presenta sean de H, postsinápticas y extrasinápticas a conos. Esto significa que la sinapsis Ph-H puede ser modulada directamente por glicina.

Conforme se ha expuesto anteriormente, la retina se organiza en circuitos antagonísticos centro-derredor; o sea que un Ph es hiperpolarizado por un punto luminoso, la H conectada a éste se hiperpolariza y disminuye la liberación de un neurotransmisor inhibitorio y el Ph adyacente, conectado con la H, se desinhibe o excita (Bonting, 1976). La glicina puede participar en estos circuitos antagonísticos, directamente sobre la sinapsis Ph-H, si es liberada por una IP que haya sido estimulada dentro de la CPI por una B de centro ON (B-ON). Por otra parte, la glicina liberada por las IP puede difundir hasta la membrana extrasináptica de las H; el efecto de una conductancia hiperpolarizante acoplaría a esta neurona con el resto de las células involucradas en el circuito antagonístico.

Considerados en conjunto, nuestros datos y aquellos que provienen de estudios inmunocitoquímicos y electrofisiológicos apoyan la participación de la glicina como un neurotransmisor dentro de la CPE de los anfibios. Pero además, nuestros datos apuntan

hacia la existencia de sitios donde alguna proteína relacionada con el RGly, o que no pertenece a éste pero que une estricnina con muy alta afinidad, participa en la comunicación neuronal. Esta proteína puede ser un intercambiador aniónico que mantenga los E_{Cl} diferentes de una neurona a otra, de modo que los neurotransmisores que abren una misma conductancia iónica hiperpolaricen o despolaricen a distintos tipos neuronales (Borges y Wilson, 1991; Gilbertson *et al*, 1991).

En la CPI la participación de la glicina puede ejercerse a través del RGly. Huba y Hoffman (1991) encontraron que las A de la retina del embrión de pollo, mantenidas en cultivo, responden a la aplicación de glicina con una corriente de Cl^- que se antagoniza por estricnina. Puesto que esas mismas células respondieron a los diversos agonistas de los receptores de glutamato, ya fueran NMDA r o no-NMDA, y puesto que se caracterizaron como GABAérgicas mediante autorradiografía (Marc, 1986) y electrofisiología, es probable que sobre las A converjan varias vías de comunicación neuronal.

En la misma línea están los resultados de Boos y sus colaboradores (1993), quienes registraron las corrientes iónicas de las A del tipo AII de la retina de la rata, caracterizando corrientes de Na^+ activadas por voltaje, de Cl^- activadas por GABA y sensibles a bicuculina, y por glicina sensibles a estricnina, y corrientes catiónicas activadas por los análogos del glutamato KA y AMPA, pero no por NMDA.

Ya que las A funcionan como moduladoras de la vía trineuronal Ph-H-B al nivel de la CPI (Wässle y Boycott, 1991), además de la opinión generalizada de que el tipo AII es glicinérgica (Marc, 1986; Pourcho y Goebel, 1990; Wässle y Boycott, 1991; Boos *et*

al, 1993), la caracterización electrofisiológica mencionada arriba sugiere que, la transmisión en sentido horizontal dentro de la CPI es mediada de forma importante por la glicina.

Las G también responden a la aplicación de glicina con una corriente de Cl⁻ antagonizada por estricnina, como demostraron Miller y sus colaboradores en el tritón (1981). Asimismo, Stone y Pinto (1992) encontraron que la generación de la respuesta antagonica centro-derredor en estas células depende de una vía en la que participa el RGly.

En particular en la interacción de estos dos tipos celulares, A y G, la glicina puede actuar como el neurotransmisor inhibitorio que medie la inhibición química de las AII sobre las G de centro OFF (G-OFF), como propusieron Sterling y colaboradores (1986). Si la AII es glicinérgica, el acoplamiento entre distintos tipos neuronales puede ocurrir a través de las uniones en hendidura con las CB-ON en la sublámina ON. Así, la estimulación de las AII por las RB (Sterling *et al*, 1986; Wässle y Boycott, 1991; Boos *et al*, 1993) conserva el signo de la transmisión (excitación-excitación; inhibición-inhibición) hacia las CB y éstas hacia las G-ON. El efecto es que, la hiperpolarización de un bastón por un estímulo luminoso desinhibe a la RB postsináptica (sinapsis inversora: excitación-inhibición; inhibición-excitación), la RB estimula a la AII (glicinérgica) y ésta inhibe a la GC-OFF, pero estimula a las CB-ON por las sinapsis eléctricas, "encendiendo" la vía ON en la CPI.

La glicina también pudiera actuar como co-agonista del glutamato en el NMDAR. Existe poca evidencia respecto a la existencia de NMDAR en la retina de los vertebrados,

como se mencionó anteriormente. Sin embargo, la co-localización inmunocitoquímica de estos aminoácidos sobre las CB es sobresaliente (Pourcho y Goebel, 1990). No obstante, la organización de los microcircuitos retinianos, como ha sido expuesta por Sterling y sus colaboradores (1986), puede servir para dar una explicación alternativa a dicha co-localización.

Los autores referidos proponen que sobre una G actúan dos entradas inversas, una inhibitoria y otra excitatoria, la suma de las cuales resulta en la respuesta neta de la célula. En el caso de las G-ON, existe una entrada a partir de una B hiperpolarizante (HPB) y otra a partir de una B despolarizante (DPB). Durante la estimulación luminosa, la HPB se inhibe y la DPB se excita; el resultado es un aumento en la entrada despolarizante y una disminución en la hiperpolarizante, con lo que la G se excita. Esto significa que deberían haberse localizado B que manejaran un neurotransmisor inhibitorio, que no es el caso (Sterling *et al*, 1986; Pourcho y Goebel, 1990). Si consideramos que una misma B pudiera manejar un neurotransmisor inhibitorio a la vez que uno excitatorio, pero que se bifurque en sus ramificaciones axónicas sobre dos G antagónicas, se encontraría una explicación al hecho de la co-localización de glutamato y glicina en estas células.

Boje y sus colaboradores (1992), en la retina del pollo, encontraron sitios de unión de glicina-³H/ACPC insensibles a estricnina; sin embargo no observaron un aumento en la neurotoxicidad provocada por el NMDA. Lo que quiere decir que el sitio de glicina insensible a estricnina en la retina del pollo quizá no esté asociado al NMDAR.

Nuestros resultados de unión específica de glicina-³H y estricnina -³H en las

fracciones membranales de la retina de la rana pueden constituir un apoyo a estas sugerencias. Hemos demostrado que la unión de los ligandos radioactivos difiere en sus propiedades cinéticas y en sus perfiles farmacológicos, de tal manera que hacen pensar en la co-existencia del RGly y del sitio de glicina asociado al NMDAr, o de algún otro sitio de unión de glicina insensible a estricnina, además de que hay una proteína que une estricnina que no parece ser el RGly típico. Su participación en la función retiniana debe explorarse en otro tipo de preparación.

Aun cuando las interrogantes planteadas requieren de otra aproximación experimental, los ensayos de unión específica nos han permitido identificar que la glicina juega más de un papel en la comunicación neuronal dentro de la retina de la rana.

REFERENCIAS

- Altschuler, R. A.; H. Betz, M. H. Parakkal, K. A. Reeks y R. J. Wenthold. (1986) *Identification of glycinergic synapses in the cochlear nucleus through immunocytochemical localization of post-synaptic receptor*. Brain Res., 369:316-320.
- Akagi, H. y R. Miledi (1988) *Heterogeneity of glycine receptors and their RNA's in rat brain and spinal cord*. Science, 242:270-273.
- Anand, H. P. J. Roberts y A. M. López-Colomé (1988) *Excitatory aminoacids in the chick retina: possible involvement of cGMP*. Neurosc. lett., 58:31-36.
- Aprison, M. H. (1970a) *Evidence of the release of ¹⁴C- glycine from hemisectioned spinal cord with dorsal root stimulation*. Pharmacologist, 12:222.
- Aprison, M. H. (1970b) *Studies on the release of glycine in the isolated spinal cord of the toad*. Trans. Am. Soc. Neurochem., 1:25.
- Aprison, M. H. (1990) *The discovery of the neurotransmitter role of glycine*. En: Ottersen, O. P. y J. Storm-Mathisen (eds), Glycine neurotransmission, John Wiley & Sons, New York. pp:1-24.
- Aprison, M. H. y W. J. McBride (1973) *Evidence for the net accumulation of glycine into a synaptosomal fraction isolated from the telencephalon and spinal cord of the rat*. Life Sci., 12:449-458.
- Bakker, M. H. M.; R. M. McKernan, E. H. Wang y A. C. Foster (1991) *MK-801-³H binding to NMDA receptor solubilized from rat brain: effects of the glycine site ligands, polyamines, fenpropidil and desipramine*. J. Neurochem., 57:39-45.
- Ball, A. K. (1987) *Immunocytochemical and autoradiographic localization of GABAergic neurons in the goldfish retina*. J. Comp. Neurol., 255:317-325.
- Becker, C-M.; H. Betz y H. Schröder (1993) *Expression of inhibitory GlycR in post-natal rat cerebral cortex*. Brain Res., 606: 220-226.
- Becker, C-M; V. Schmieden, P. Tarrani, U. Strasser y H. Betz (1992) *Isoform-selective deficit of GlycR in the mouse mutant spastic*. Neuron, 8:283-289.
- Betz, H. (1991) *Glycine receptors: heterogenous and widespread in the mammalian brain*. TINS, 14:458-461.
- Boje, K. J.; P. Skolnick, J. Raber, R. T. Fletcher y G. Chader (1992) *Strychnine-*

insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. Neurochem. Int., 20:473-486.

Bonting, S. L. (1976) En: Bonting, S. L. (ed) *Structure and mechanisms of the vertebrate visual system.* Transmitters in the visual process, Pergamon Press, Oxford, pp:1-26.

Boos, R.; H. Schneider y H. Wässle (1993) *Voltage- and transmitter- gated currents of All AC in a slice preparation of the rat retina.* J. Neurosci., 13:2874-2888.

Borba, H.; W. E. Müller y U. Wöllert (1981) *Specific strychnine binding associated with GlyR in bovine retina.* Brain Res., 205: 131-139.

Borges, S. y M. Wilson (1991) *Dual effects of glycine on HC of the tiger salamander retina.* J. Neurophysiol., 66:1993-2001.

Bormann, J. (1990) *Patch-clamp studies of glycine-gated chloride channels.* En: Ottersen, O. P. y J. storm-Mathisen, Glycine Neurotransmission, pp:111-138.

Bormann, J.; O. P. Hamill y B. Sakmann (1987) *Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and Γ -amino- butyric acid in mouse cultured spinal neurons.* J. Physiol., 385: 243-286.

Boycott, B. B. y H. Wässle (1974) J. Physiol., 240:379-419.

Bylund, D. B. y H. I. Yamamura (1990) *Methods for receptor binding* En: Yamamura, H.; S. J. Enna y M. Kuhar (eds): Methods in neurotransmitters receptor analysis. Raven Press, New York, pp: 1-36.

Chin, C. A. y D. Lam (1980) *The uptake and release of 3 H-glycine in the goldfish retina.* J. Physiol., 308:185-195.

Cordi, A.; J. Monahan y J. Reisse (1990) *A topological model of the NMDA-glycine receptor model.* J. Receptor Res., 10:299-315.

Coull, B. M. y R. W. Cuttler. (1978) *Light-evoked release of endogenous glycine into the perfused vitreous of the intact rat eye.* Invest. Ophthalm. Vis. Sci., 17:682

Cubells, J. F.; Ch. Ndubuka y M. H. Makman (1991) *2- amino- 4- phosphonobutyric acid (APB) exerts a light dependent effect on post- gabaculine levels of retinal GABA: evidence that ON synaptic pathways regulate retinal GABAergic transmission.* J. Neurochem., 57:46-52.

Cutting, G. R.; L. Lu, B. F. O'hara, L. M. Kasch C. Montrose-Rafizadeh, D. M. Donovan,

S. Shimada, S. E. Antonarakis, W. B. Guggino, G. R. Uhl y H. H. Kazazian (1991) *Cloning of the GABA_A α cDNA: A GABA receptor subunit highly expressed in the retina.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:2673-2677.

Daly, E.C. (1990) *The biochemistry of glycinergic neurons.* En: Ottersen, O. P. y J. Storm-Mathisen (eds) Glycine neurotransmission. John Wiley & Sons, New York, pp: 25-66.

Dasgupta, P. y A. Narayanaswami (1982) *Serine transhidroxy- methylase activity in the vertebrate retina .* J. Neurochem., 39: 743-746.

Davidoff, R. A. y R. Adair (1976) *GABA and glycine transport in the CNS: high affinity uptake and potassium- evoked release in vitro.* Brain Res., 118:403

Davidoff, R. A.; R. P. Shank, L. T. Graham, M. H. Aprison y R. Werman (1967) *Association of glycine with spinal interneurons.* Nature, 214:680-681.

De Feudis, F. V.; L. M. Orsanz Muñoz, y J. L. Fando (1978) *High affinity glycine binding sites in the rat CNS: regional variation and strychnine sensivity.* Gen. Pharmacol., 9:171-176.

Dickinson, J. C. y P. B. Hamilton (1966) *The free aminoacids of human spinal fluid determined by ion exchange chromatography.* J. Neurochem., 13:1179-1187.

Dohman, H. G.; J. Thorner, M. G. Caron y R. J. Lefkowitz (1991) *Model systems for the study of seven-transmembrane segment- receptors.* Ann. Rev. Biochem., 60:653-688.

Dowling, J. E. y B. B. Boycott (1966) Proc. Roy. Soc. Lon., 166:80.

Dudzinski, D. S. y R. W. Cutler (1974) *Spinal subarachnoid perfusion in the rat: glycine transport from spinal fluid.* J. Neurochem., 22:355-361.

Ehinger, B. y B. Lindberg (1974) *Light-evoked release of glycine from the retina.* Nature, 251:727-728.

Ehinger, B. y B. Lindberg (1976) *Light evoked release of glycine from cat and rabbit retina.* Brain Res., 113:535

Eldred, W. D. y K. Cheung (1989) *Immunocytochemical localization of glycine in the retina of the turtle.* Vis. Neurosc., 2:331-338.

Enna, S. J. y S. H. Snyder (1975) *Properties of GABA receptor binding in rat brain synaptic fractions.* Brain Res., 100:81-97.

Enroth-Cugell, C. y J. G. Robson (1966) *The contrast sensitivity of retinal GC of the cat*. J. Physiol., 187:517-552.

Famiglietti, E. V. y H. Kolb (1974) J. Neurophysiol., 41:472-483.

Farber, D. y R. Adler (1986) *Issues and questions in cell biology of the retina*. En: Farber, D. y R. Adler (eds) The retina: a model for cell biology studies. Academic Press, Florida, pp:2-16.

Felgspan, A.; H. Wässle y J. Bormann (1993) *Pharmacology of GABA receptors chloride channels in rat BC*. Nature, 361:159-162.

Fesenko, E. E.; S. S. Kolesnikov y Lyubarsky A. L. (1985) Nature, 313:310-313.

Fletcher, E. J.; P. M. Beart y D. Lodge (1990) *Involvement of glycine in excitatory neurotransmission*. En: Ottersen, O. P. y J. Storm-Mathisen, Glycine neurotransmission, pp:193-218.

Foster, A.C. y J. A. Kemp (1989) *HA-966 antagonizes NMDA receptor through a selective interaction with the glycine modulatory site*. J. Neurosci., 9:2191-2196.

Foster, A. C.; J. A. Kemp, P. D. Leeson, S. Grimwood, A. E. Donald, G. R. Marshall, T. Priestley, J. D. Smith y R. W. Carling (1992) *Kynurenic acid analogues with improved affinity and selectivity for the glycine site on the NMDA receptor from rat brain*. Mol. Pharmacol., 41:914-922.

Fricke, U. (1975) *Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100*. Analyt. Biochem., 63:555-558.

García-Calvo, M.; A. Ruiz-Gómez, J. Vázquez, E. Morato, F. Valdivieso y F. Mayor Jr. (1989) *Functional reconstitution of the GlyR*. Biochem., 28:6405-6409.

Gent, J. P. y T. A. Wacey (1983) *The effects of chlormethiazole on single unit activity in rat brain; interactions with inhibitory and excitatory neurotransmitters*. Br. J. Pharmacol., 80:439-444.

Gilbertson, T. A.; S. Borges y M. Wilson (1991) *The effects of glycine and GABA on isolated HC from tiger salamander retina*. J. Neurophysiol., 66:2002-2013.

Graham, D.; F. Pfeiffer y H. Betz (1981) *UV light- induced cross-linking of strychnine to the GlyR of rat spinal cord membranes*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 102:1330-1335.

Gray, N. M.; M. S. Dappen, B. K. Cheng, A. A. Cordi, J. P. Biesterfeldt, W. F. Hood y J. B. Monahan. (1991) *Indol- 2- carboxylates as novel ligands for the strychnine- insensitive*

NMDA-linked glycine receptor. J. med. Chem., 34:1283-1292

Grenningloh, G.; A. Rienitz, B. Schmitt, H. Betz, B. Methfessel, M. Zensen, K. Beyreuther y E. D. Gundelfinger (1987) *The strychnine binding subunit of the GlyR shows homology with nicotinic acetylcholine receptors.* Nature, 328:215-220.

Grenningloh, G.; V. Schmieden, P. R. Schofield, P. H. Seeburg, T. Siddique, T. K. Mohandas, C.M. Becker y H. Beyz (1990a) *α - subunit variants of the human GlyR: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes.* EMBO J., 9:771-776.

Grenningloh, G.; I. Pribilla, P. Prior, G. Malthaup, K. Beyreuther, O. Talèb y H. Betz (1990b) *Cloning and expression of the 58 kDa β subunit of the inhibitory GlyR.* Neuron, 4:963-970.

Grimwood, S.; A. M. Moseley, R. W. Carling, P. D. Leeson y A. C. Foster (1992) *Characterization of the binding of L- 689, 560- 3 H, an antagonist for the glycine site on the NMDA receptor to rat brain membranes.* Mol. Pharmacol., 41:923-930.

Grünert, U. y H. Wässle (1993) *Immunocytochemical localization of GlyR in the mammalian retina.* J. Comp. Neurol., 335:523-537.

Harrison, N. L. y M. A. Simmonds (1983) *Two distinct interactions of barbiturates and chlormethiazole with the GABA_A receptor complex in rat cuneate nucleus in vitro.* Br. J. Pharmacol., 80:387-394.

Hochstein, S. y R. M. Shapley (1976) *Quantitative analysis of retinal GC-classifications.* J. Physiol., 262:237-264.

Huba, R. y H. D. Hofmann (1991) *Transmitter-gated currents of GABAergic AC-like cells in chick retinal cultures.* Vis. Neurosc., 6:303-314.

Hurt, S. D. y B. M. Baron (1991) *3 H-5,7- dichlorokynurenic acid, a high affinity ligand for the NMDA receptor glycine regulatory site.* J.Receptor Res., 11:215-220 .

Ishida, A. T. y J. Neyton (1985) *Quisqualate and L-glutamate inhibit retinal HC responses to kainate.* Proc. Natl. Acad. Sc., 82:1837-1841.

Jager, J y H. Wässle (1987) *Localization of glycine uptake and receptors in the cat retina.* Neurosc. Lett., 75:147:151.

Johnson, J. W. y P. Ascher (1987) *Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons.* Nature, 325:529-531.

- Johnston, G. A. R. y L. L. Iversen (1971) *Glycine uptake in the CNS slices and homogenates: evidence for different uptake mechanisms in spinal cord and cerebral cortex.* J. Neurochem., 18: 1951-1961.
- Jordan, C. C. y R. A. Webster (1971) *Release of acetylcholine and ¹⁴C- glycine from the cat spinal cord in vitro* Br. J. Pharmacol., 43:441P.
- Joseph-Bravo, P.; J. L. Charli y Hugo Aréchiga (1983) *Propiedades generales de las neuronas peptidérgicas.* En: Pasantes-Morales, H. y H. Aréchiga (eds) Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. UNAM, México, pp:125-140.
- Kaneko, A. (1987) *The functional role of retinal horizontal cells.* Japan J. Physiol., 37:341-358.
- Kaupp, U. B. y K-W. Koch (1986) *Mechanism of photoreception in vertebrate vision.* TIBS, 11:43-47.
- Kemp, A. J.; A. C. Foster, P. D. Leeson, T. Priestley, R. Tridgett, L. H. Iversen y G. N. Woodruff (1988) *7-cloro- kynurenate is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the NMDA receptor complex.* Proc Natl. Acad. Sci., 85: 6547-6550.
- Kemp, J. A. y P. D. Leeson (1993) *The glycine site of the NMDA receptors: five years on.* TIPS, 14:20-25.
- Kessler, M.; T. Terramani, G. Lynch y M. Baudry (1989) *A glycine site associated with NMDA receptor: characterization of a new class of antagonists.* J. Neurochem., 52:1319-1328.
- Kirsch, J.; D. Langosch, P. Prior, U. Z. Liltauer, B. Schmitt y H. Betz (1991) *The 93 kDa GlyR associated protein binds to tubulin.* J. Biol. Chem., 266:22242-22245.
- Kishimoto, H.; J. R. Simon y M. H. Aprison (1981) *Determination of the equilibrium dissociation constants and number of glycine binding sites in several areas of rat CNS, using a Na⁺- independent system .* J. Neurochem., 37:1015-1024.
- Kleckner, N. W. y R. Dingledine (1989) *Selectivity of quinoxalines and kynurenines as antagonists of the glycine site on the NMDA receptors.* Mol. Pharmacol., 36:430-436.
- Krogsgaard-Larsen, P.; H. Hjed, D. R. Curtis, J. D. Leah y M. J. Peet (1982) *Glycine antagonists structurally related to muscimol, THIP or isoguvacine.* J. Neurochem., 39:1319-1324.
- Kuhse, J.; V. Schmieden y H. Betz (1990) *A single aminoacid exchange alters the pharmacology of neonatal rat GlyR subunit.* Neuron, 5:867-873.

Langosch, D.; H. Betz y C-M. Becker (1990) *Molecular structure and developmental regulation of the inhibitory GlyR*. En: Ottersen, O. P. y J. Storm-Mathisen, J. (eds) Glycine neurotransmission, John Wiley & Sons, New York. pp:67-82.

Langosch, D.; W. Hoch y H. Betz (1992) *The 93 kDa protein gephyrin and tubulin associated with the inhibitory GlyR are phosphorylated by an endogenous protein kinase*. FEBS lett., 298:113-117.

Leeson, P. D.; R. W. Carling, K. W. Moore, A. M. Moseley, J. D. Smith, G. Stevenson, T. Chan, R. Baker, A. C. Foster, S. Grimwood, J. Akene, G. R. Marshall y K. Hoogsteen (1992) *4- amido 2- carboxytetrahydro-quinolines. Structure-activity relationships for antagonism at the glycine site of the NMDA receptor*. J. Med. Chem., 35:1954-1968.

Lewis, C. A. y D. S. Faber (1993) *GABA responses and their partial occlusion by glycine in cultured rat medullary neurons*. Neuroscience, 52:83-96.

Logan, W. J. y S. H. Snyder (1972) *High affinity uptake system for glycine, glutamic acid and aspartic acid in synaptosomes of the rat central nervous tissue*. Brain Res., 42:413-431.

López-Colomé, A. M.; R. Salceda y H. Pasantes-Morales (1978) *Potassium- stimulated release of GABA, glycine and taurine from the chick retina*. Neurochem. Res., 3:431-441.

Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem., 193:265-275.

Marc, R. E. (1985) *The role of glycine in retinal circuitry*. En: Morgan, W. W. (ed) Retinal transmitters and modulators: models for the brain. CRC Press, Boca Raton, Fla. pp: 119-158.

Marc, R. E. (1986) *The development of retinal networks*. En: Farber, D. B. y R. Adler (eds) The retina: a model for cell biology studies (I), Academic Press, New York. pp:17-65.

Marvizón, J. C.; M. García-Calvo, J. Vázquez, F. Mayor Jr., A. Rufz-Gómez, F. Valdivieso y J. Benavides (1986) *Activation and inhibition of ³H- strychnine binding to the GlyR by Eccles anions: modulatory effects of cations*. Mol. Pharmacol., 30:598-602.

Marvizón, J-C.; A. H. Lewin y P. Skolnick (1989) *1-amino-cyclopropan-carboxylic-acid: a potent and selective ligand of the glycine modulatory site of the NMDA receptor complex*. J. Neurochem., 52:992-994.

Marvizón, J. C.; J. Vázquez, M. García Calvo, F. Mayor Jr., A. Rufz-Gómez, F. Valdivieso y J. Benavides (1986) *The GlyR: pharmacological studies and mathematical modeling*

of the allosteric interaction between glycine- and strychnine-binding sites. Mol. Pharmacol., 30:590-597.

Miller, R. F. y R. F. Dacheux (1983) *Intracellular chloride in retinal neurons: measure and meaning.* Vision Res. 23:399-411.

Miller, R. F.; T. E. Frumkes, M. Slaughter y R. F. Dacheux (1981) *Physiological and pharmacological basis of GABA and glycine actions on neurons of mudpuppy retina.* J. Neurophysiol., 45:743-804.

Mulder, A. H. y S. H. Snyder (1974) *Potassium-induced release of aminoacids from cerebral cortex and spinal cord slices of the rat.* Brain Res., 76:297-308.

Müller, W. E. y S. H. Snyder (1978) *Glycine high affinity uptake and strychnine binding associated with glycine receptors in the frog CNS.* Brain Res. 143:487-498.

Murray, J. E. y R. W. Cutler (1970) *Clearance of glycine from cat cerebrospinal fluid: faster clearance from spinal subarachnoid than from ventricular compartment.* J. Neurochem., 17:703-704.

Neal, M. J. y H. Pickles (1969) *Uptake of ¹⁴C-glycine by spinal cord.* Nature, 223:679.

O'Dell, T. J. y B. N. Christenson (1989) *HC from catfish retina contain two types of excitatory aminoacids receptors.* J. Neurophysiol., 61:1097-1109.

Pan Z. H. y S. T. Lipton (1992) *Redox modulation of the glycine evoked current in rat GC.* Soc. Neurosc. Abs., 18:394.

Pasantes-Morales y J. Morán (1988) *Correlaciones morfológicas y funcionales en los procesos integrativos de la vía visual.* Ciencia, 39:15-24.

Pfeiffer, F. y H. Betz. (1981) *Solubilization of glycine receptor from rat spinal cord.* Brain Res., 226:273-279.

Pfeiffer, F.; D. Graham y H. Betz. (1982) *Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord.* J. Biol. Chem., 257:9389-9393.

Pfeiffer, F.; R. Simler, G. Grenningloh y H. Betz. (1984) *Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord.* Proc. Natl. Acad. Sci., 81:7224-7227.

Polenzani, L. R. M. Woodward y R. Miledi (1991) *Expression of mammalian GABA receptors with distinct pharmacology in Xenopus oocytes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88:4318-4322.

- Pourcho, R. G. y D. J. Goebel (1990) *Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine-containing neurons in the retina*. En: Ottersen, O. P. y J. Storm-Mathisen (eds) Glycine neurotransmission, John Wiley & Sons, New York, pp: 355-390.
- Prince, R. J. y M. A. Simmonds (1992) *Steroid modulation of the strychnine-sensitive GlyR*. Neuropharmacol., 31:201-205.
- Prior, P.; B. Schmit, G. Grenningloh, I. Pribilla, G. Mutthaupt, K. Beryreuther, Y. Maulet, P. Werner, D. Langosch, J. Kirsch y Betz, H. (1992) *Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative GlyR-tubulin linker protein*. Neuron, 8:1161-1170.
- Qian, H. y J. E. Dowling (1993) *Novel GABA responses from rod-driven HC*. Nature, 361:162-164.
- Rao, T. S.; N. M. Gray, M. S. Dappen, J. A. Cler, S. J. Mick, M. R. Emmett, S. Iyengar, J. B. Monahan, A. A. Cordi y P. L. Wood (1993) *Indole-2-carboxylates, novel antagonists of the NMDA-associated glycine recognition sites: in vivo characterization*. Neuropharmacol., 32:139-147.
- Riesgo Escovar, J. R. (1988) *Acumulación de $^{45}\text{Ca}^{++}$ en células aisladas del epitelio pigmentario de la retina de pollo*. Tesis Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Ruiz-Gómez, A.; C. Fernández-Shaw, E. Morato, J. C. Marvizón, J. Vázquez, F. Valdivieso y F. Mayor Jr. (1991) *Sulphydryl groups modulate the allosteric interaction between glycine binding sites at the inhibitory GlyR*. J. Neurochem., 56:1690-1697.
- Ruiz Gómez, A.; C. Fernández-Shaw, F. Valdivieso y F. Mayor Jr. (1989) *Chemical modification of the GlyR with fluorescein-isothiocyanate specifically affects the interaction of glycine with its binding site*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 160:374-81.
- Ruiz-Gómez, A.; M. García-Calvo, J. Vázquez, J. C. Marvizón y F. Mayor Jr. (1989) *Thermodynamics of the agonist and antagonist interaction of the strychnine-sensitive GlyR*. J. Neurochem., 52: 1775-1780.
- Ruiz-Gómez, A; E Morato, M. García-Calvo, F. Valdivieso y F. Mayor Jr. (1990) *Localization of the strychnine binding site on the 48 kDa subunit of the GlyR*. Biochem., 29:7033-7040.
- Ruiz-Gómez, A.; M. L. Vaello, F. Valdivieso y F. Mayor Jr. (1991) *Phosphorylation of the 48 kDa subunit of the GlyR by protein kinase-C*. J. Biol. Chem., 266:559-566.
- Sakmann, B.; O. P. Hamill y J. Bormann (1982) *Activation of chloride channels by putative inhibitory transmitters in spinal cord neurons*. Plüggers Arch., 392:R19.

Sakmann, B; O. P. Hamill y J. Bormann (1983) *Patch-clamp measurements of elementary chloride currents activated by putative inhibitory transmitters GABA and glycine in mammalian spinal neurons.* J. Neural. Transm. Suppl. 18:83-95.

Salceda, R. (1988) *Glicina.* En: Pasantes-Morales, H. y H. Aréchiga (eds) Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas. UNAM, México, pp: 71-82.

Salceda, R. (1988) *El proceso de la fototransducción en la retina de los vertebrados.* Ciencia. 39:9-14.

Salceda, R. (1989) *Uptake and K⁺-stimulated release of ¹⁴C-glycine from frog retinal synaptosomal fractions.* Neurochem. res., 14:49-54.

Saransaari, P. y S. S. Oja (1992) *Glycine binding to cerebral cortical membranes from developing and adult mice: interactions with β -alanine.* Soc. Neurosc. Abs., 18:

Schaeffer, J. M. y S. Anderson (1981) *Identification of strychnine binding sites in the rat retina.* J. Neurochem., 36: 1597-1600.

Schmieden, V.; J. Kuhse y H. Betz (1992) *Agonist pharmacology of neonatal and adult GlyR α -subunits: identification of aminoacids residues involved in taurine activation.* EMBO J., 11:2025-2032.

Shapley, R. y V. H. Perry (1986) *Cat and monkey retinal GC and their visual functional roles.* TINS. 9:229-235.

Shimada, S.; G. Cutting y G. R. Uhl (1992) *GABA_A or GABA_C receptor? GABA_A receptor induces bicu- barbiturates and benzodiazepines GABA responses in Xenopus oocytes.* Mol. Pharmacol., 41:683-687.

Sivilotti, L. y A. Nistri (1990) *Pharmacology of a novel effect of GABA in the frog optic tectum in vitro.* Eur. J. Pharmacol., 164: 205-212.

Slaughter, M. M. y R. F. Miller (1991) *Characterization of serine inhibitory action on neurons in the mudpuppy retina.* Neuroscience. 41:817-825.

Smiley, J. F. y S. Yazulla (1990a) *Glycine stimulates calcium- independent release of ³H-GABA from isolated retinas of Xenopus laevis.* J. Neurosci., 4:337-348.

Smiley J. F. and S. Yazulla (1990b) *Glycinergic contacts in the OPL of the Xenopus laevis retina characterized by antibodies to glycine, GABA and GlyR.* J. Comp. Neurol. 299:375-388.

Somohano, F.; P. J. Roberts y A. M. López-Colomé (1988) *Maturational changes in*

retinal excitatory aminoacids receptors. Devl. Brain Res., 42:59-67.

Sterling, P.; M. Freed y R. G. Smith (1986) *Microcircuitry and functional architecture of the cat retina*. TINS, 9:186-192.

Stockton, R. A. y M. M. Slaughter (1991) *Depolarizing actions of GABA and glycine on amphibian HC*. J. Neurophysiol., 65:680-692.

Stone, Ch. y L. H. Pinto (1992) *Receptive field organization of retinal GC in the spastic mutant mouse*. J. Physiol., 456:125-142.

Stone, Ch. y L. H. Pinto (1993) *Response properties of GC in the isolated mouse retina*. Visual Neurosc., 10:31-39.

Storm-Mathisen, J. y O. P. Ottersen (1990) *Antibodies and fixatives for the immunocytochemical localization of glycine*. En: Ottersen, O. P. y J. Storm-Mathisen, Glycine neurotransmission, pp:281-302.

Takagi, T.; I. Pribilla, J. Krisch y H. Betz (1992) *Co-expression of the receptor associated protein gephyrin changes the ligand binding affinities of α_2 GlyR*. FEBS lett., 303:178-180.

Takahashi, T. y A. Momiyama (1991) *Single channel currents underlying GlyR post-synaptic responses in spinal neurons*. Neuron, 7:965-969.

Tapia, R. (1983) *El ácido Γ -amino butírico*. En: Pasantes-Morales, H. y H. Aréchiga (eds) Aminoácidos y péptidos en la Integración de funciones nerviosas. UNAM, México, pp:71-82.

Tedeschi, E.; S. Dukler, P. Pfeiffer y D. Lavie (1968) *Studies on strychnine derivatives and conversion into brucine*. Tetrahedron, 24:4573-4580.

Theding, K. H.; M. S. Benedict y G. E. Fagg (1989) *The NMDA receptor complex: a stoichiometric of the radioligand binding domains*. Neurosc. lett., 104:217-222.

Thomson, A. M. (1990) *Glycine is a co-agonist at the NMDA receptor/ channel complex*. Prog. Neurobiol., 35:53-74.

Tokutomi, M.; M. Kaneda y N. Akaike (1989) *What confers specificity on glycine for its receptor site?*. Br. J. Pharmacol., 97:363-360.

Triller, A.; F. Pfeiffer, H. Betz y H. Korn (1985) *Distribution of glycine receptors at central synapses: An immunoelectron microscopy study*. J. Cell. Biol., 101:683-688.

Twyman, R. E. y R. L. Macdonald (1991) *Kinetic properties of the GlyR main- and subconductances of mouse spinal cord neurones in culture.* J. Physiol., 435:303-331.

Unnerstall, J. R. (1990) *Computer-assisted analysis of binding data.* En: Yamamura, H. I.; S. J. Enna y M. Kuhar Methods in neurotransmitter receptor analysis. Raven Press, New York, pp:37-68.

Vandenberg, R. J.; C. R. French, P. H. Barry, J. Shine y P. R. Schofield (1992) *Antagonism of ligand-gated ion channel receptors: two domains of the GlyR α -subunit form the strychnine binding site.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89:1765-1769.

Vázquez, M. L.; D. J. Garland, E. T. San, J. A. Cler, S. J. Mick, W. F. Hood, J. B. Monahan, S. Iyengar y T. S. Rao (1992) *Characterization of 3- carboxy- 5-phosphono- 1,2,3,4- tetrahydro isoquinoline (SC-48961), a potente competitive NMDA receptor antagonist, in vitro and in vivo.* Neurosci. lett., 135:149-152.

Voaden, M. J. (1976) *GABA and glycine as retinal transmitters.* En: Bonting, S. L. (ed) Transmitters in the visual process. Pergamon Press, Oxford, pp: 107-126.

Wässle, H. y B. B. Boycott (1991) *Functional architecture of mammalian retina.* Physiol. Rev., 71:541-586.

Watt, C. B.; D. M-K. Lam y S. M. Wu (1988) *Quantitative studies on enkephalin's coexistence with GABA, glycine and neurotensin in AC of the chicken retina.* Brain res., 444:366-370.

Watt, C. B.; H-B Li y D. M-K. Lam (1985) *The presence of three neuroactive peptides in putative glycinergic AC of an avian retina.* Brain Res., 348:187-191.

Weiler, R. y H. K. Ball (1984) *Co-localization of neurotensin- like immunoreactive and 3 H-glycine uptake system in sustained AC of the turtle retina.* Nature, 311-759-761.

Werman, R. y M. H. Aprison (1968) *Glycine: the search for a spinal cord inhibitory transmitter.* En: von Euler, C.; S. Skoglund y U. Soderberg (eds) Structure and functions of inhibitory neuronal mechanisms. Pergamon Press, Oxford, pp: 473-486.

Werman, R.; P.A. Davidoff y M. H. Aprison (1967) *Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine.* Nature, 214:681-683.

Wood, P. L.; M. R. Emmet, T. S. Rao, S. J. Mick, J. L. Cler y S. Iyengar (1990) *In vivo cerebellar cGMP responses: a model for the studies of the NMDA-associated glycine receptor.* En: Guidotti, A. (ed) Neurotoxicity of excitatory aminoacids. Raven Press, New York, pp:223-234.

- Woodward, R. M.; L. Polenzani y R. Miledi (1992) *Characterization of bicuculline/baclofen- insensitive GABA receptors expressed in Xenopus oocytes. I: effects of Cl channels inhibitors.* Mol. Pharmacol., 42:165-173.
- Wu, F-S.; T. T. Gibbs y D. H. Farb (1990) *Inverse modulation of GABA- and glycine induced currents by progesterone.* Mol. Pharmacol., 37:597-602.
- Wu, S. M. y D. M-K. Lam (1988) *The coexistence of three neuroactive sustances in AC of the chicken retina.* Brain Res., 458:195-198.
- Yamashita, M. y H. Wässle (1991) *Responses of rod BC isolated from the rat retina to the glutamate agonist APB.* J. Neurosc., 11:2372-2382.
- Yang, X-L y S. M. Wu (1989) *Effects of prolonged lighth exposure, GABA and glycine on HC responses in tiger salamander retina.* J. Neurophysiol., 61:1025-1035.
- Yang, X-L. y S.M. Wu (1993) *Effects of GABA on HC in the tiger salamander retina.* Vision Res., 33:1339-1344.
- Yazejian, S. y L Fain (1992) *Excitatory amino acids receptors on isolated GC from the goldfish.* J. Neurophysiol., 67:94-107.
- Yazulla, S. y K. M. Studholme (1991a) *Glycinergic IP cells make synaptic contact with AC in goldfish retina.* J. Comp. Neurol., 310:1-10.
- Yazulla S. y K. M. Studholme (1991b) *GlyR immunoreactivity in retinal BC is postsynaptic to glycinergic and GABAergic AC synapses.* J. Comp Neurol., 310:11-20.
- Young, A. B. y S. H. Snyder (1973) *Strychnine binding associated with GlyR of the CNS.* Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 70:2832-2836.
- Young, A. B. y S. H. Snyder (1974a) *Strychnine binding in rat spinal cord membranes associated with the synaptic GlyR: cooperativity of glycine interactions.* Mol. Pharmacol., 0: 790-809.
- Young, A. B. y S. H. Snyder (1974b) *The glycine synaptic receptor: evidence that strychnine binding is associated with the ionic conductance mechanism.* Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 71:4002-4005.
- Zhou, Z. J.; G. L. Fain y J. E. Dowling (1993) *The excitatory and inhibitory aminoacids receptors on HC isolated from the white perch retina.* J. Neurophysiol., 70:8-19.

LISTA DE ABREVIATURAS

A: células amacrinas

AbGly: antisuero que reconoce glicina en forma libre

ACPC: ácido amino- ciclo propano- carboxílico

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazo-4-propiónico

B: células bipolares

B-ON: células bipolares de centro ON= bipolares despolarizantes

B-OFF= células bipolares de centro OFF= bipolares hiperpolarizantes

B_{max}: número máximo de sitios de unión

CB: células bipolares de conos

CNE: capa nuclear externa

CNI: capa nuclear interna

CPE: capa plexiforme externa

CPI: capa plexiforme interna

DPB: células bipolares despolarizantes

E_{Cl}: potencial de equilibrio del ión Cl⁻

G: células ganglionares

G-ON: células ganglionares de centro ON

G-OFF: células ganglionares de centro OFF

G α : células ganglionares alfa

GABA: ácido γ -amino-butírico

G β : células ganglionares beta

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GTP: trifosfato de guanosina

H: células horizontales

HA966: 3-amino-1-hidroxi-pirrolidin-2-ona

HPB: células bipolares hiperpolarizantes

IP: células interplexiformes

KA: ácido kaínico

K $_D$: constante de disociación

mAb 4a: anticuerpo monoclonal que reconoce la subunidad α del receptor de glicina

mAb 7a: anticuerpo que reconoce la subunidad de 93 KDa del receptor de glicina

NMDA: N-metil D-aspartato

P1: fracción sinaptosomal de la capa plexiforme externa

P2: fracción sinaptosomal de la capa plexiforme interna

PDE: fosfodiesterasa

Ph: fotorreceptores

RBC: células bipolares de bastones

RGly: receptor de glicina

SHMT: serina-hidroxi-metil-transferasa