

95
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACION DEL SISTEMA DE
CAPTACION DE GLICINA EN LA
RETINA.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JOSE ESTUARDO LOPEZ VERA



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1997



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Caracterización del Sistema de Captación de Glicina
en la retina.

realizado por José Estuardo López Vera
con número de cuenta 9354998-5 , pasante de la carrera de Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario
Propietario
Propietario
Suplente
Suplente

Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Dr. Jesús Manuel León Cazares
Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
M. en IBB. Jorge Alberto Pérez León
Dr. Octavio Quesada García

Comité Departamental de Biología

M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA

Luis Salceda S.
Jesús Manuel León Cazares
Luis Alfonso Vaca Domínguez
Jorge Alberto Pérez León
Octavio Quesada García

FACULTAD DE CIENCIAS



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Rocio Salceda Sacanelles, en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M.

El alumno tuvo beca del Programa de Iniciación temprana a la investigación, (durante el periodo de febrero de 1995 a febrero de 1996) así como beca del Programa de Becas para tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (durante el periodo de febrero de 1997 a noviembre de 1997) ambas por parte de la fundación UNAM.

A mis Padres Ing Estuardo López Martínez y Profra. Ma. Elvira Vera Frutos por su apoyo incondicional y a los cuales les dedico esta tesis

A mi hermana Sandra Luz López Vera

A mis abuelos: Amalia Frutos Jiménez

Regina Martínez Vázquez

Armando López Martínez

AGRADECIMIENTOS

Creo que esta es la parte mas difícil de la realización de cualquier tesis, debido a que son tantas la persona, a las cuales le debo de agradecer por haber participado de alguna manera en la realización de mis estudios, como de esta tesis, que sería vergonzoso omitir a alguna de ellas por lo que solamente puedo decirles MUCHAS GRACIAS.

Y si me lo permiten quisiera agradecer de una manera especial a las siguientes personas:

A la Dra. Rocío Salcedo Sacanelles por su apoyo y paciencia en la realización en la realización de éste trabajo así como haberme iniciado en este duro pero satisfactorio camino de la investigación.

A los miembros del jurado, Dr. Jesús Manuel León Cazares, M. En C. Jorge Alberto Pérez León, Dr. Luis Vaca Dr. Octavio Quesada por sus comentarios y correcciones que enriquecieron este trabajo.

A la Tte. Coronel Leticia Cid Marín.

A Jorge "el Socio" y Daniel por considerarme como un amigo.

A mis amigos

Malco Castilleja Cid

Eduardo Muñoz García

Andrés Gómez Glockner

Dorina Basurto Lozano

**A mis compañeros del laboratorio Jorge, Gustavo, Daniel, Víctor, Marisela, Natalia
Carmen, Raymundo, Alejandro Aide**

RESUMEN

Se considera a la glicina como un neurotransmisor inhibitor en diferentes áreas del sistema nervioso central, incluyendo la retina. En las retinas de los vertebrados, la glicina parece actuar como un neurotransmisor inhibitor. Una propiedad esencial de la transmisión sináptica es la eliminación del neurotransmisor liberado, que se realiza por medio de un transporte de alta afinidad dependiente de sodio que lleva acabo la remoción del neurotransmisor del espacio sináptico. La inhibición o estimulación del transporte puede ser un mecanismo que regule los niveles del neurotransmisor liberado y su acción postsináptica. La fosforilación de proteínas es un mecanismo general de regulación y estos transportadores de glicina presentan sitios posibles de fosforilación.

En el presente trabajo se caracterizó, en la retina de la rana el transporte de glicina de alta afinidad así como sus posibles mecanismos de regulación. Nuestros resultados indican que la acumulación de glicina- ^3H se lleva acabo a través de un mecanismo saturable, de alta afinidad y dependiente de Na^+ , y no parece regularse por la actividad de la proteína cinasa C. La diferente susceptibilidad a sarcosina sugiere que existen diferentes sistemas de transporte de glicina en las fracciones sinaptosomales provenientes de las capas plexiformes externa e interna de la retina.

INDICE

INTRODUCCION

Estructura y Función	1
Desarrollo embrionario	6
Neurotransmisión	8
La glicina	10
OBJETIVO	20

METODOS

Aislamiento del tejido	21
Aislamiento de sinaptosomas	21
Acumulación de glicina	22
Acumulación de glicina en las fracciones sinaptosomales	22
Determinación de nucleótidos cíclicos	23
Determinación de proteínas	23
RESULTADOS	24
DISCUSION Y CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFIA	39

INTRODUCCION

La retina es una porción del sistema nervioso central, cuya función consiste en la captura de fotones y la conversión de esta energía en impulsos eléctricos, que se transmiten a los centros superiores del cerebro. En particular el estudio de la retina es muy interesante, desde el punto de vista neurobiológico, ya que presenta un arreglo en estratos celulares con funciones definidas, que aunado a su fácil acceso, la hace un modelo interesante para estudiar los mecanismos de transmisión e integración de la información en el sistema nervioso central (SNC).

Diversos estudios morfológicos han demostrado que las retinas de todos los vertebrados presentan un patrón estructural común y solamente se han observado pequeñas diferencias entre las retinas de las diferentes especies estudiadas.

ESTRUCTURA y FUNCION

La retina se encuentra ubicada en el fondo del globo ocular de los vertebrados en la denominada copa óptica (Fig.1). El globo ocular presenta varias capas tisulares, la más externa de recubrimiento, 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 el ojo; la coroides forma en la parte anterior del globo ocular al iris y la pupila. Del iris se encuentra pendiente el cristalino que por los movimientos del primero, concentra los rayos luminosos que penetran al ojo y se proyectan

en la retina. Después de la coroides, se encuentra el epitelio pigmentario de la retina (EPR), que se separa de la primera por una lámina basal o de Bruch. El EPR se denomina de tal manera por que sus células producen y almacenan melanina la que le da una coloración negra característica. Este epitelio, protege de los niveles excesivos de luz incidente sobre la retina, posee una actividad fagocítica periódica, que participa en la renovación de los segmentos externos (SE) de los fotorreceptores, y forma parte de la barrera hemato-retiniana (Faber y Adler, 1986).

La siguiente capa hacia el interior del globo ocular es la retina, cuya composición consiste en seis tipos de neuronas localizadas en estratos o capas: la capa de fotorreceptores, la capa nuclear interna formada por los somas de las células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes, y la capa de células ganglionares que se encuentran en el margen interno de la retina cuyos axones constituyen el nervio óptico (Fig. 2) (Dowling, 1978)

Las terminales de los fotorreceptores forman contactos sinápticos con las células horizontales y bipolares, las que constituyen la capa plexiforme externa (CPE). La capa plexiforme interna (CPI), está formada por las sinápsis entre las células bipolares, amacrinas y ganglionares.

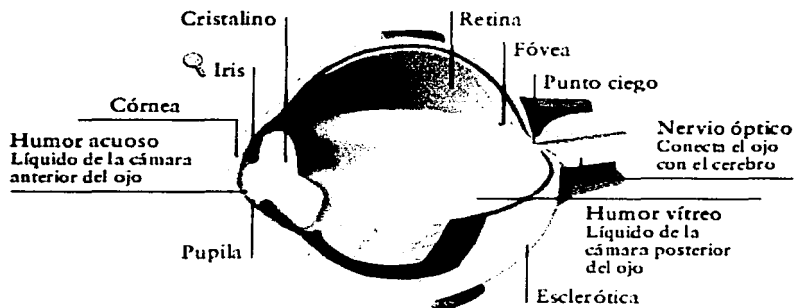


Figura 1. Diagrama del ojo de los vertebrados

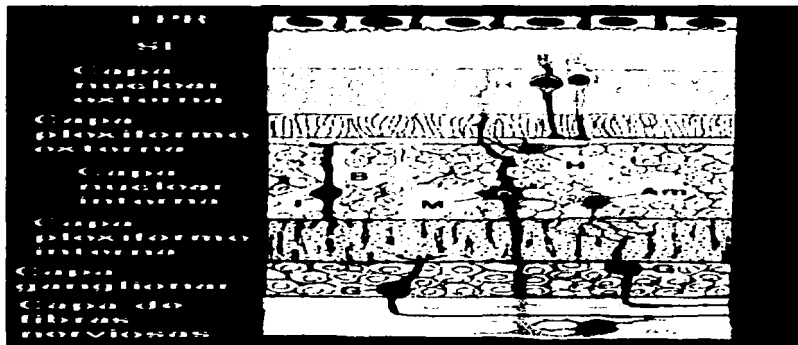


Figura 2. Los tipos neuronales y las capas en que se disponen en la retina de los vertebrados. Fotorreceptores: conos (C) y bastones (R); células bipolares (B), células horizontales (H), células amacrinas (Am) células interplexiformes (I) y células ganglionares (G). La letra (M) corresponde a la célula de Müller que es la más prominente de las células gliales en la retina.

Los estudios electrofisiológicos demostraron que la retina al ser expuesta a un estímulo luminoso, produce una respuesta eléctrica rápida, denominada onda a, correspondiente a la hiperpolarización de los fotorreceptores, esta onda, es seguida por una onda lenta, positiva, denominada onda b, la cual se piensa es generada en las células de la capa interna (Fig. 3). Frecuentemente se observa una onda c, que parece corresponder a la actividad del epitelio pigmentario de la retina (Brown, 1968).

El estímulo luminoso actúa sobre la célula fotorreceptora y su respuesta (onda a) es transmitida en sentido vertical hacia las células bipolares y ganglionares. Esta transmisión es modulada por las células horizontales y amacrinas.

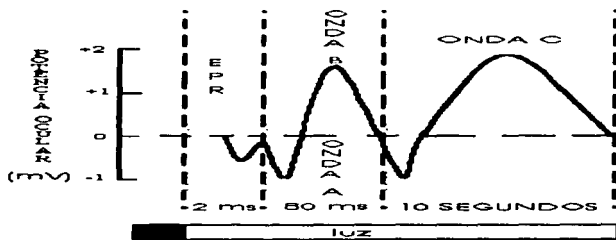


Figura3. Electroretinograma de un mamífero. Se muestran todas las ondas de que se compone.

DESARROLLO EMBRIONARIO

La retina, se desarrolla, al igual que el cerebro, a partir de la placa neural del ectodermo anterior. La placa neural presenta una depresión en su centro llamada surco neural, cuyos bordes se fusionan gradualmente y forman el tubo neural. La parte anterior del tubo neural presenta tres dilataciones conocidas como vesículas primarias: el proscencéfalo, el mesencéfalo y rombencéfalo (Farber y Adler, 1986). El proscencéfalo, a su vez, se subdivide en telencéfalo y diencéfalo, éste último da origen a las vesículas ópticas, cuerpos geniculados laterales, tallos ópticos y al quiasma. La superficie de las vesículas ópticas prolifera y se invagina en la copa óptica, en cuyo interior se desarrolla el cristalino que deriva del ectodermo. La pared externa de la copa óptica permanece como una capa de células cuboidales que dan origen al epitelio pigmentario de la retina, cuerpo ciliar e iris. La pared interna de la copa óptica prolifera y da origen a la retina, al epitelio ciliar no pigmentado y al epitelio posterior del iris (Fig. 4).

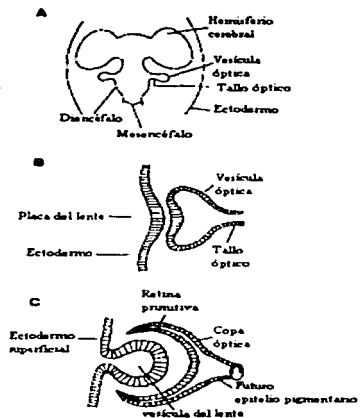


Figura 4. Representación esquemática del desarrollo de la retina de los vertebrados y estructuras relacionadas. A. Región anterior del tubo neural dividida en las vesículas. B. Vesícula óptica que induce al ectodermo superficial a formar el cristalino. C. Copa óptica embrionaria (Tomado de Farber y Adler, 1986)

Existen estudios que han demostrado la aparición de los distintos tipos celulares de la retina en tiempos específicos durante el desarrollo. Las células ganglionares son las primeras en diferenciarse, seguidas por las amacrinas, bipolares, horizontales y por último los fotorreceptores. La aparición de las sinapsis, así como la presencia de los diferentes neurotransmisores, corresponde con la aparición de los distintos tipos celulares y la formación de las sinapsis correspondientes (Fung, et al, 1982; Grun, 1982; Marc, 1986). Sin embargo aun no se conocen con precisión las distintas líneas celulares, ni el tiempo en que el precursor adquiere características morfológicas y fisiológicas definidas.

NEUROTRANSMISION

La comunicación entre las diferentes neuronas se lleva a cabo en la sinapsis que se considera una unidad anatómica exclusiva de las células nerviosas. Esta sinapsis puede ser de dos tipos, eléctrica y química. La transmisión preferente en la retina es de tipo química. Esta se lleva a cabo mediante la liberación de una molécula al espacio intersináptico, la cual, al interactuar con un receptor en la membrana de la célula postsináptica, genera una señal eléctrica que puede ser transmitida a la siguiente célula.

Para poder considerar cualquier molécula como neurotransmisor, éste debe de cumplir ciertas características que pueden resumirse de la siguiente manera (Werman, 1966).

a) Estar presente en las sinapsis donde supuestamente ejerce su acción.

b) En la sinapsis deben existir mecanismos de síntesis y degradación del supuesto neurotransmisor.

c) Ser liberado de la terminal sináptica por estímulos despolarizantes

d) El compuesto debe producir cambios eléctricos en la membrana postsináptica similares a los que provoca la liberación del transmisor natural, con idénticas propiedades en cuanto a conductancia a las especies iónicas que participan y con la misma sensibilidad farmacológica.

e) Ser inactivado a nivel sináptico ya sea por transformación química, difusión o recaptura.

En la retina, una variedad de compuestos reúnen estas características, así se consideran como posibles neurotransmisores a la acetilcolina (ACh), al glutamato, al aspartato, la glicina, al ácido-gamma aminobutírico (GABA), etc. Se tiene evidencia que la ACh y dopamina son sustancias neurotransmisoras retinianas, liberadas de diferentes poblaciones de células amacrinas, el glutámico y/o el aspártico son neurotransmisores liberados de los fotorreceptores, las células bipolares y las ganglionares. Los aminoácidos GABA y glicina se liberan de neuronas inhibitoras: células horizontales y amacrinas (Morgan, 1985).

La función de estos neurotransmisores inhibitorios en la modulación de la transmisión de tipo horizontal en la retina aún requiere de mayor estudio.

LA GLICINA

La glicina, el aminoácido estructuralmente más sencillo, además de constituir parte de las proteínas, es metabólicamente activo, participa en la síntesis de bases púricas y de otros aminoácidos.

Adicional a su función metabólica, la glicina se considera como un neurotransmisor inhibitor en diferentes áreas del SNC, incluyendo la retina (Marc, 1985).

Los niveles de este aminoácido en la retina de varias especies varían de 1 a 7 $\mu\text{mol/g}$, valores semejantes a los encontrados en la médula espinal de los vertebrados (3 y 5 $\mu\text{mol/g}$).

La glicina se forma a partir de la serina, de la cual se conocen dos rutas de síntesis: una fosforilación, que utiliza la deshidrogenasa del ácido fosfoglicérico, y por la deshidrogenación del D-glicerato. La primera reacción ha sido demostrada en extractos libres de células, y es probablemente la ruta principal de síntesis, ya que está ampliamente distribuida en las diferentes regiones del SNC. La enzima que participa en esta reacción cataliza la oxidación del 3-fosfoglicerato, dependiente de NAD, la síntesis de la serina se completa por subsecuente transaminación e hidrólisis (Fig. 5). Esta reacción es catalizada por la serina hidroximetil transferasa (SMHT) y requiere la presencia de fosfato de piridoxal (FP), tetrahidrofolato (FH4) y iones de manganeso (Salceda 1988). Esta enzima se presenta en todos los tejidos, sin embargo en el tejido nervioso, incluida la retina, su actividad es de dos a tres veces mayor con respecto a tejidos no glicinérgicos (Marc, 1985).

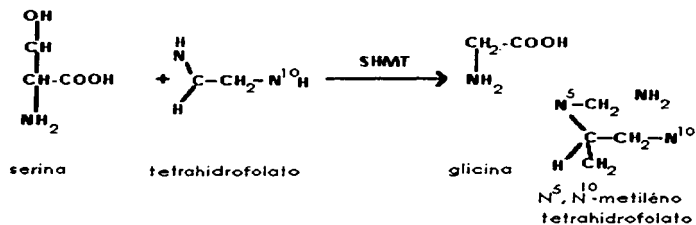
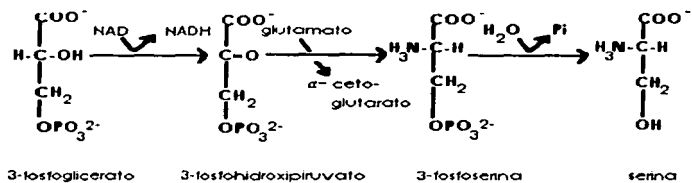


Figura 5. La síntesis y degradación de la glicina se lleva a cabo por la serina-hidroxi-metil-transferasa (SHMT). Tomado de Salceda (1988).

Son varios los estudios que indican que la glicina funciona como neurotransmisor en la capa plexiforme interna de la retina de los mamíferos. Los estudios autorradiográficos demostraron que la glicina se acumula en las células amacrinas, ganglionares y por ciertas células bipolares en la retina del gato (Pourcho y Goebel, 1990). En las retinas de los peces y anfibios, la glicina parece actuar como neurotransmisor en la capas plexiformes externa e interna. La glicina se acumula en la capa plexiforme externa en sitios discretos en la retina del pez dorado (Marc, 1985), *Xenopus* (Rayborn et al, 1981) y la rana (Marshall y Voaden, 1976; Salceda, 1988). Así mismo la glicina afecta los potenciales de membrana y la respuesta a la luz en las células horizontales de peces y de *Xenopus* (Negishi y Drijan, 1979; Wu y Dowling, 1980 y Stone y witkowsky, 1984).

La liberación de glicina por estimulación eléctrica, luminica y despolarizante se ha demostrado en la retina de varias especies (Bauer, 1977; Salceda, 1989; López-Colomé et al, 1978a,1978b).

El efecto postsináptico de la glicina, es mediado por la presencia de un receptor que es un canal de Cl^- , el cual es antagonizado específicamente por estriquina. Los estudios inmunohistoquímicos han revelado la presencia del receptor postsináptico de glicina en la zona interna de la retina de los mamíferos (Grünert y Wässle, 1993) y en ambas capas plexiformes de la retina de la rana (Pérez-León y Salceda, 1995).

Adicional al efecto hiperpolarizante de la glicina, mediado por el receptor postsináptico sensible a estriquina, se ha demostrado que ésta

actúa como coagonista del glutamato en los receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Johnson y Ascher, 1987).

Los primeros estudios que demostraron la existencia de un sistema de transporte de glicina capaz de eliminar a ésta del espacio sináptico, se realizaron en la médula espinal de diferentes especies de vertebrados (Neal y Pickles, 1969). Más tarde se encontró la presencia de dos sistemas de transporte uno de baja afinidad presente en todos los tejidos, con una $K_m = 923 \mu M$ y es conocido como sistema de transporte "A", que es inhibido por alanina y serina; y un sistema de transporte de alta afinidad asociado a neuronas, con una $K_m = 26 \mu M$ (Logan y Snyder, 1972). El sistema de transporte de baja afinidad, está asociado al metabolismo general de los tejidos, que incluye su nutrición y procesos de destoxificación. Mientras que el sistema de transporte de glicina, de alta afinidad, se considera que está asociado a la eliminación rápida del neurotransmisor del espacio sináptico (Logan y Snyder, 1972).

Los sistemas de transporte de glicina de alta afinidad, 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) así como en la retina de varias clases de vertebrados (Marc, 1985) (Tabla I).

Tabla I. Acumulación de glicina por el sistema de transporte de alta afinidad en tejidos del SNC.

Tejido	Km(μ M)	V _{max} (pmol/min/g)	Referencia
Médula espinal de rata	20	ND*	Bennett et al, 1972
Médula espinal de rana	26	ND*	Davidoff y Adair, 1976
Retina de conejo	28	150	Brunn y Ehinger, 1972
Retina de rana	17	6	Voaden et al, 1974
Retina del pez dorado	8	9	Chin y Lam, 1980

*No determinado

El uso de las técnicas de la biología molecular han permitido la clonación de los transportadores de diversos aminoácidos. El primer transportador de aminoácidos que se clonó, secuenció y expresó fue el del GABA, que se obtuvo del cerebro de la rata (Guastella et al. 1990) y siguiendo este método, posteriormente se han clonado otros transportadores incluyendo al de glicina (Smith et al.1992; Liu et al 1992; Guastella et al. 1992).

Estos estudios han llevado a la identificación de dos familias de transportadores de neurotransmisores. La primera comprende al transportador de glutamato acoplado a una corriente de sodio y potasio. La segunda familia incluyen los transportadores del GABA, glicina, taurina, norepinefrina, dopamina y serotonina; estos transportadores son dependientes de sodio y cloro y no es necesario el ion K^+ para su funcionamiento (Fig. 6)(Kanner.1994; Amara y Kuhar, 1993; Rudnick y Clark, 1993; Nelson y Lill, 1994; Worrall y Williams. 1994).

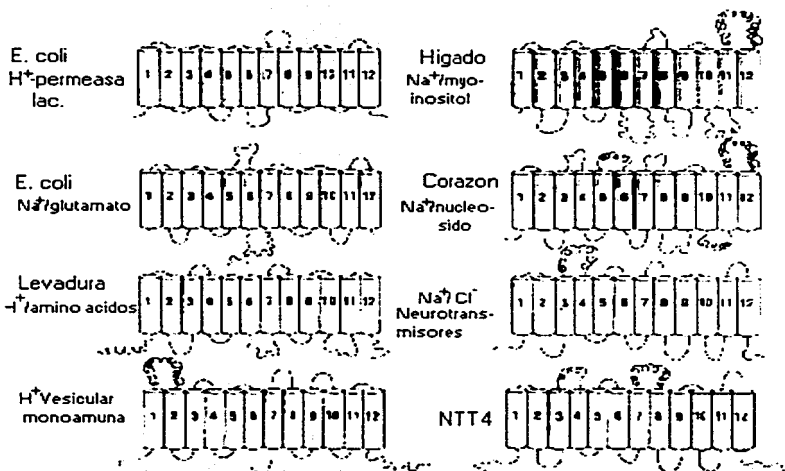


Figura. 6 Representación de las 12 hélices transmembrales y las asas de los transportadores. Tomado de Nelson y Lill(1994).

Los transportadores de la segunda familia poseen una identidad en secuencia del 30 a 65% y comparten similitud en estructura. Están constituidos aproximadamente por 600 aminoácidos arreglados en 12

segmentos transmembranales, su extremo amino y carboxilo son citoplasmicos, y contienen en esta región una secuencia pequeña de aminoácidos con sitios posibles de fosforilación y con una gran asa potencialmente glucosilada entre las hélices III y IV. (Nelson y Lill 1994).

Con base en esta homología, la familia puede ser subdividida en cuatro subgrupos: a) transportadores de aminas biogénicas (noradrenalina, dopamina y serotonina); b) varios transportadores de GABA, taurina y creatina; c) transportadores de prolina y glicina; y d) los transportadores huérfanos. (Kanner, 1994)

Dos tipos de transportadores de glicina (GLYT) se han clonado: el GLYT1 y el GLYT2, con un peso de 50 a 70 y 90 a 110 kDa, respectivamente. El GLYT1 tiene tres variantes GLYT1a, GLYT1b y GLYT1c que difieren en su secuencia del amino terminal como resultado de un procesamiento del ARNm diferente (Fig. 6) (Smith et al. 1992; Guastella et al. 1990; Liu et al 1992)

Los transportadores GLYT1 y GLYT2 presentan de un 48 a un 50% de homología en cuanto a su contenido de aminoácidos. Sin embargo varían entre sí en su estructura terciaria, especificidad de tejido y propiedades farmacológicas (Fig.7). Así el GLYT1 se expresa en concentraciones altas en la médula espinal, tallo cerebral, diencéfalo y la retina de la rata, y en menor grado en el bulbo olfatorio y los hemisferios cerebrales (Zafra et al 1995). Para el GLYT2 su expresión esta restringida a la médula espinal, tallo cerebral y cerebelo (Zafra et al 1995).



Figura 7. Esquema de la estructura secundaria de los dos diferentes tipos de transportadores de alta afinidad de glicina A) GLYT1 y B) GLYT2.

En los últimos años, se ha considerado a los mensajeros intracelulares como posibles elementos regulatorios de los sistemas de transporte. Gomeza y colaboradores (1996), demostraron en cultivos de astrocitos, que los activadores de la proteína cinasa C (PKC) regulan el transporte de

GABA; así el forbol 12-miristrato 13-acetato (PMA) causó una inhibición del transporte de GABA de manera dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. Estos resultados se confirmaron en sinaptosomas de corteza cerebral de rata y en ovocitos de *X. laevis*, donde se observó que el 12-O-tetradecanoil forbol 13-acetato (TPA), otro activador de la PKC, también inhibe la recaptura de GABA mediada por el transportador GAT-1 (Osawa et al 1994).

Gomez y colaboradores (1996), demostraron que el GLYT1 incorporado en líneas celulares de neuroblastomas (C6) es inhibido por ésteres de forbol.

En la retina de la rana no se ha identificado la presencia del GLYT1 y el GLYT2, sin embargo reportaron que el GLYT1 está presente en células gliales y el GLYT2 en neuronas. (Jursky y Nelson, 1996)

OBJETIVO

Con base en lo expuesto el presente trabajo tiene como objetivo la caracterización del sistema de transporte de glicina de alta afinidad, en la retina de la rana e identificar si en la retina el transportador de glicina es modulado por la actividad de la proteína cinasa C (PKC) o por segundos mensajeros como son los nucleótidos cíclicos y/o el calcio

METODOS

Aislamiento del tejido

Las retinas se obtuvieron de ranas (*Rana pipiens*), adaptadas previamente a la obscuridad durante dos horas, bajo luz tenue roja, los animales se sacrificaron por decapitación y se extrajo el globo ocular, éste se cortó a nivel ecuatorial, se separó la porción anterior y con la ayuda de unas pinzas se aisló la retina.

Las retinas una vez aisladas se colocaron en Ringer Krebs-Bicarbonato (RKB) con una composición (en mM) de NaCl 118; KCl 4.7; KH_2PO_4 1.2; CaCl_2 2.5; MgSO_4 1.17; Glucosa 5.6; NaHCO_3 25 a un pH de 7.4.

Aislamiento de sinaptosomas

Los sinaptosomas se aislaron según el método reportado por Salceda (1989). Las retinas en RKB se agitaron durante un minuto, con el objeto de eliminar los segmentos externos de los fotorreceptores; después, las retinas se homogenizaron al 10% en una solución de sacarosa 0.28 M y en presencia de MgSO_4 100 μM . El homogenado se centrifugó a 1,000 g durante 10 minutos. Se conservó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con el mismo volumen de la solución de sacarosa- MgSO_4 . Se repitió la centrifugación y el botón se conservó como la fracción P1, enriquecida en sinaptosomas de la capa plexiforme externa. La mezcla de los sobrenadantes se centrifugó a 11,000g durante 20 minutos, el botón,

fracción P2, está enriquecido en sinaptosomas correspondientes a terminales de la capa plexiforme interna.

Acumulación de glicina en la retina

La acumulación de glicina- ^3H se realizó a 37°C en la obscuridad. El tejido se incubó a diferentes tiempos en 1 ml de RKB que contenía glicina- ^3H (0.25 μCi , New England Nuclear) a una concentración final de 10 μM . Una vez transcurrido el tiempo de incubación respectivo se lavó el tejido a 4°C , se pesó y digirió con 0.5 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% a 40°C durante 30 minutos. Una vez digerido el tejido se le agregaron 5 ml de Tritosol (Fricke, 1975) y la radioactividad acumulada se determinó en un contador de centelleo líquido (Beckman, LS 1701).

Acumulación de glicina- ^3H en las fracciones sinaptosomales

La acumulación de glicina- ^3H en las fracciones sinaptosomales de la retina de la rana, se llevó a cabo incubándolas a 37°C en RKB (36 a 80 μg de proteína/ml) en presencia de glicina- ^3H (10 μM). Después de 10 minutos de incubación se centrifugó a 1,000 rpm durante 30 segundos, el sedimento se lavó superficialmente con medio frío. La radioactividad incorporada se determinó por centelleo líquido como se mencionó.

Cuando se estudió el efecto de diferentes drogas, éstas se agregaron al mismo tiempo que la glicina- ^3H excepto cuando se indique lo contrario en el texto. El efecto de Na^+ en la acumulación de glicina se

estudió sustituyendo éste por cloruro de colina o cloruro de litio y por KHCO_3 .

En los experimentos en que se estudió el efecto del pH en la captación de glicina, se substituyó el NaHCO_3 por el HEPES (ácido N'-2-etanol sulfónico N-2 hidroxietilpiperazina).

La estaurosporina y el forbol 12-miristrato 13- acetato (PMA) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y la concentración final de éste en el medio fue de 0.01%, concentración a la que no tuvo efecto sobre la acumulación de glicina- ^3H .

Determinación de nucleótidos cíclicos

Los niveles de los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPC, se determinaron en estratos perclóricos por un método de radioinmunoensayo, utilizando los reactivos comerciales de Amersham

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas de las fracciones sinaptosomales se determinó de acuerdo al método de Lowry (1951), (se uso una solución de albúmina como estándar).

RESULTADOS

La acumulación de glicina- ^3H fue lineal durante los primeros 10 minutos y alcanza los niveles máximos a los 20 minutos de incubación (17.8 nmol/mg)(Fig. 8).

Con el objeto de conocer la dependencia del Na^+ en la acumulación de glicina- ^3H se probaron diferentes concentraciones de éste en el medio de incubación. La ausencia de Na^+ causó una inhibición del 100% en la acumulación de glicina- ^3H . Se requiere 70 mM de Na^+ para obtener el 50% de la acumulación máxima de glicina- ^3H . La sustitución de éste por cloruro de litio no permitió la acumulación de glicina- ^3H (Fig. 9). Por medio del programa inplot4, se calculó el coeficiente de Hill de los datos presentados en la figura 9 y se encontró que el número de sitios para Na^+ en el transportador es de 2.

El transporte de glicina- ^3H se inhibió en un 40% en presencia de 1mM de N-metilglicina (sarcosina), inhibición que no aumentó aún a concentraciones diez veces mayores (Fig. 10). La estricnina, antagonista del receptor postsináptico de la glicina, no afectó la acumulación de glicina- ^3H (Fig. 11).

Con el fin de saber si el transportador de glicina está modulado por segundos mensajeros, se probaron diversos compuestos que modifican los niveles de nucleótidos cíclicos (AMPC y GMPC) y drogas que inhiben la actividad de la PKC.

La acumulación de glicina-³H aumentó en un 70% en presencia de 1mM de teofilina, la cual se conoce que eleva los niveles de los nucleótidos cíclicos por inhibir la actividad de la enzima que los convierte en AMP y GMP (la fosfodiesterasa). Sin embargo ni la forskolina, activador de la adelinato ciclasa enzima que cataliza la formación del AMPc a partir de ATP, ni la IBMX (isobutil-metil-xantina) inhibidor de la fosfodiesterasa tuvieron efecto en la acumulación de glicina-³H.

La acumulación de glicina-³H no se modificó en presencia de estaurosporina o de diferentes concentraciones de PMA, aún si estas drogas se adicionaron 45 minutos antes que la glicina-³H. Resultados similares se obtuvieron en la retina de la rata (Tabla. II)

El pH no parece afectar el sistema de transporte de glicina-³H, ya que cuando el medio se acidificó (6.5) o alcalinizó (7.9) la acumulación de glicina no se alteró. Asimismo el calcio no parece influir en el transporte de glicina-³H, pues la presencia de 2 mM de EGTA o del ionóforo de calcio A23187 (19 μ M), no modificaron los niveles de acumulación de glicina-³H en la retina (Tabla. III)

La acumulación de glicina-³H en las fracciones sinaptosomales P1 y P2, presentó saturación en función del tiempo de incubación y alcanzó a los 10 minutos de incubación, valores de 1.58 y 2.29 nmol/mg proteína respectivamente.

Esta acumulación no se modificó en presencia de teofilina (1 mM), forskolina (10 μ M), PMA (0.5 μ M) o estaurosporina (1 μ M) (Tabla. IV).

El efecto de la sarcosina en la acumulación de glicina- ^3H se estudió a diferentes concentraciones, y se observó una IC_{50} de $40 \mu\text{M}$ y $60 \mu\text{M}$ en las fracciones sinaptosomales P1 y P2 respectivamente (Fig. 12).

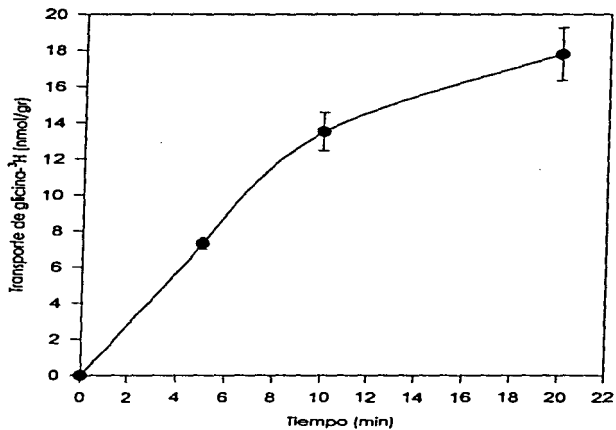


Figura 8. Curso temporal de la acumulación de glicina- ^3H ($10 \mu\text{M}$) en la retina incubada a 37°C en la obscuridad. Los valores en cada tiempo son el promedio de 8 experimentos independientes \pm error estándar.

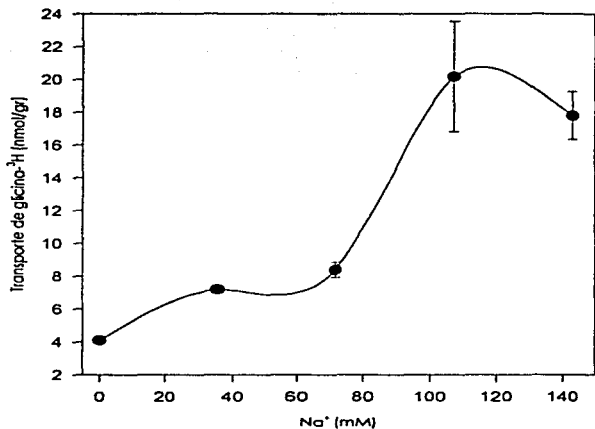


Figura 9. Dependencia de Na⁺ en la acumulación de glicina-³H incubada a 37°C. En cuanto a la osmolaridad se substituyo el NaCl por cloruro de colina. Los valores en cada punto son el promedio de 4 experimentos independientes \pm error estándar.

Tabla II. Efecto de varios fármacos en la acumulación de glicina-³H en la retina.

FARMACOS	ACUMULACION (nmol/gr)	
	5 minutos	20 minutos
Control	7.31 ± 0.32	17.8 ± 1.46
Teofilina (1mM)	13.0 ± 1.5*	29.1 ± 2.9*
Foskolina (10 µM)	6.16 ± 0.39	17.35 ± 2.16
IBMX (1mM)	7.81 ± 1.14	17.51 ± 1.53

La acumulación de glicina-³H (10µM) se realizó en la retina a 37°C, a los 5 y 20 minutos de incubación. Los resultados son el promedio de 10 experimentos independientes ± error estandar. * p < 0.001

Tabla III. Efecto del pH o del Ca⁺⁺ en la acumulación de glicina-³H en la retina.

	ACUMULACION (nmol/gr)
Control	17.8±1.46
pH 6.5	16.5±3.7
pH 7.9	18 ± 4.4
EGTA (2mM)	16.8 ± 3.0
A23187 (19µM)	19 ± 2.5

La acumulación de glicina-³H (10 µM) se realizó a 37°C, a los 20 minutos de incubación. Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes ± error estandar.

Tabla IV. Efecto de diferentes fármacos en la acumulación de glicina-³H en las fracciones sinaptosomales de la retina P1 y P2.

FARMACOS	ACUMULACION (nmol/mg proteína)	
	P1	P2
Control	1.58 ± 0.12	2.3 ± 0.26
Teofilina (1mM)	1.49 ± 0.19	2.29 ± 0.27
Forskolina (10µM)	1.32 ± 0.44	1.80 ± 0.14
PMA (5µM)	1.27 ± 0.34	1.97 ± 0.16
Estauosporina (1µM)	1.42 ± 0.29	1.92 ± 0.13

La acumulación de glicina-³H (10 µM) se realizó durante 10 minutos a 37°C. Los resultados son el promedio de 5 experimentos independientes ± error estándar.

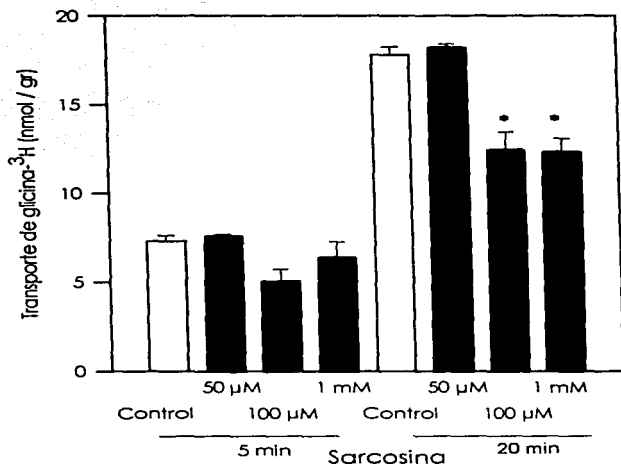


Figura 10. Efecto de la sarcosina en la acumulación de glicina-³H. Los resultados son el promedio de 7 experimentos ± error estándar. * p < .001

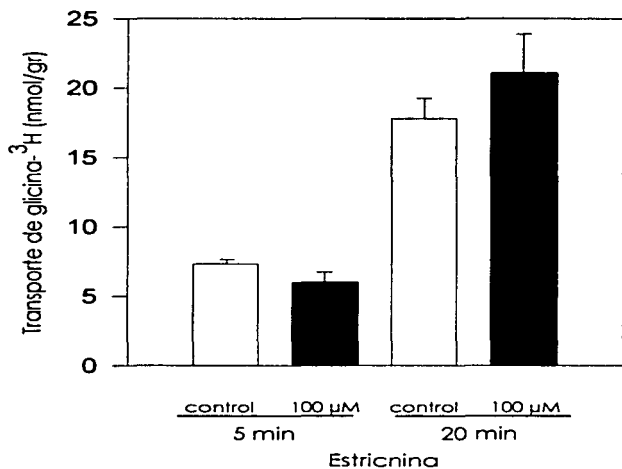


Figura 11. Efecto de la estricnina en la acumulación de glicina- ^3H . Los resultados son el promedio de 7 experimentos \pm error estándar

Fracciones sinaptosomales

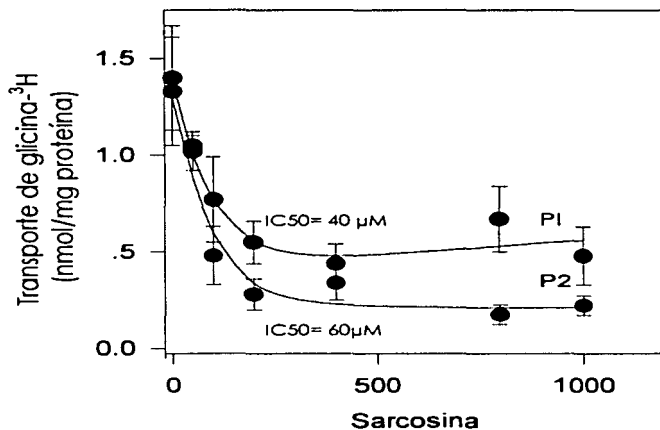


Figura 12. Efecto de la sarcosina en la acumulación de glicina-³H en las fracciones sinaptosomales P1 y P2. Los resultados son el promedio de 4 experimentos independientes ± error estándar. Se determinó una IC₅₀ de 40 µM y 60 µM para las fracciones P1 y P2 respectivamente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De acuerdo con Werman (1966) una de las características para considerar a un compuesto como neurotransmisor es la presencia de mecanismos específicos para su eliminación del espacio sináptico, ya sea por medio de una actividad enzimática que degrade el neurotransmisor o bien por un mecanismo de recaptura. Este último se considera que ocurre a través de un sistema de transporte de alta afinidad dependiente de Na^+ . La dirección del transportador depende del gradiente de Na^+ a través de la membrana, y por lo tanto depende de la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ (Müller y Snyder, 1978; Kuhar y Zarbin, 1978)

Algunos estudios previos realizados en el laboratorio demostraron, en la retina de la rana, la presencia de un sistema de transporte específico y de alta afinidad para la glicina- ^3H (Salceda, 1989). En el presente trabajo se determinó que la acumulación de glicina depende de la presencia de Na^+ , la acumulación máxima de glicina- ^3H se observó a una concentración de 100 mM en el medio de incubación. El requerimiento de Na^+ es absoluto y éste no es substituido por Li^+ (Fig. 9). Es interesante que el transportador de glicina, presente en la retina de la rana, tenga un sitio para glicina (Salceda, 1989) y 2 para Na^+ (éste trabajo). Zafra reportó que el transportador de glicina en el cerebro tiene una estequiometría de 2 Na^+ por una molécula de glicina. Así mismo, el efecto del Na^+ en la acumulación de glicina sugiere que puede ser un mecanismo cooperativo (Fig. 9).

El hecho de que la acumulación de glicina- ^3H no se modificó por cambios en el pH ni por la presencia de Ca^{++} , sugiere que la acumulación de glicina en la retina está mediada por el mismo tipo de transportador reportado en la médula y/o cerebro (Lui et al 1992)

La caracterización del sistema de transporte de glicina de alta afinidad en el SNC se ha realizado mediante el uso de drogas y análogos estructurales. Se considera a la sarcosina como el mejor inhibidor del transporte de glicina de alta afinidad, sin embargo este análogo estructural causa una inhibición parcial del 65% a concentraciones de sarcosina 100 veces mayores que la constante de afinidad del transportador por glicina (Johnson y Iversen, 1971). De acuerdo con estos resultados en la retina de la rana la sarcosina (1mM) causó una inhibición del 40% en la acumulación de glicina (Fig. 10) . La sarcosina inhibió en una proporción diferente la acumulación de glicina en las fracciones sinaptosomales de la retina de la rana, esta diferente susceptibilidad a la sarcosina sugiere la existencia de distintos sistemas de transporte de glicina en las capas plexiformes externa e interna de la retina de la rana. Por otra parte existe evidencia de que el transportador de glicina GLYT2 no se inhibe por sarcosina, a diferencia del GLYT1 (Liu et al 1993)

La eliminación del neurotransmisor del espacio sináptico depende, aparentemente, de la actividad del transportador, por lo que resulta obvio que esta actividad debe estar regulada. Efectivamente estas proteínas presentan posibles sitios de fosforilación, como se ha reportado para el GABA, , para el caso del GLYT1 se conocen 3 sitios posibles de fosforilación

(Guastella et al 1992). Gomeza et al (1995) reportaron que el transportador de glicina GLYT1 clonado de médula espinal y expresado en células de origen glial, presenta una regulación negativa mediada por la PKC. Este efecto se debe a que estas proteínas tienen residuos que pueden ser fosforilados, principalmente de serina. Recientemente algunos estudios inmunohistoquímicos demostraron la presencia del GLYT1 en la retina de la rata (Zafra et al. 1995)

Nuestros resultados no concuerdan con lo reportado por estos autores, ya que el PMA (activador de la PKC), a una concentración 200 nM a 1 μ M o de estaurosporina 1 μ M (inhibidor de la PKC) no tuvieron efecto en la acumulación de glicina- 3 H en la retina de la rana, ni en fracciones sinapto-somales de ésta ni en la retina de la rata albina.

Estos resultados no indican una deficiencia en nuestro procedimiento experimental, ya que en nuestras condiciones, el PMA causó una inhibición en la acumulación de GABA- 3 H en la retina de la rata, de igual manera a lo reportado por el grupo de Corey y colaboradores (1994). Congruente con nuestros resultados recientemente Dowd y Robinson (1996), reportaron que el GLYT1 expresado en células C6 no es modulado por la presencia de PMA.

El transporte de glicina en la retina de la rana puede presentar otros tipos de regulación. El aumento en la acumulación de glicina observado en presencia de teofilina (Tabla. II) podría explicar un regulación en la actividad del transportador de glicina por medio de la actividad de la proteína cinasa A (PKA), ya que se ha demostrado que la teofilina incrementa los niveles de AMPc, debido a que es un inhibidor de la

fosfodiesterasa y un agonista de los receptores de adenosina tipo A1 (Thompson, 1991).

Nuestros resultados apoyan la presencia de un sistema de transporte de glicina de alta afinidad, dependiente de Na^+ y que es sensible a sarcosina .

Sin embargo y debido a que la caracterización farmacológica y estequiometrica de los transportadores GLYT1 y GLYT2 es limitada, no podemos definir cual de ellos existe en la retina. Aunque los estudios inmunohistoquímicos demostraron la presencia de GLYT1 en la retina de la rata (Zafra et al 1995) y este transportador se modula por PKC en células de glioma,, nosotros al igual que Dowd y Robinson no confirmamos este tipo de regulación. Nuestros resultados sugieren que en la retina de la rana o no existe el GLYT1 o éste se regula de manera diferente al de la medula espinal.

**ESTA TESIS NO DEBE
VALER DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFÍA

Amara, S G y M J Kuhar (1993) Neurotransmitter transporter: recent progress. Annu Rev Neurosci. 16:73-93.

Bauer, B (1977) Factor affecting the spontaneous release of ^3H -glycine from rabbit retina. Acta Ophthalmol. 55:931-934.

Bennett, J O, Logan, W J y S h Snyder (1972) Amino acid neurotransmitter candidates: sodium-dependent high-affinity uptake by unique synaptosomal fractions. Science. 178:997-999.

Brown, K T (1968) The electroretinogram: It's components and their origins. vision res 8:633-677.

Brunn, A y Ehinger, B (1972) Uptake of the putative neurotransmitter, glycine, into the rabbit retina. Invest Ophthalmol Vision Sci 22:589-592.

Chin, C A y Lam, D M K (1980) The uptake and release of (3H) glycine in the godfish retina. J Physiol (London), 308:185-189.

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. 118:403-405.

Dowd, L y Robinson M B (1996) Rapid stimulation of EAAC1- mediated Na⁺-dependent-glutamate transporter activity in C6 glioma cells by phorbol ester J Neurochem 67:(2)508-516.

Dowling, J E And Ehinger, B (1978). The interplexiform cells systems. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. Proc R Soc Lond [Biol.], 201:7-26.

Farber, D and Adler, R (1986). Issues and questions in cell biology of the retina. En: Adler, R. and Faber, D. (Eds.) The retina Parte I, Academic Press Florida, pp 2-16.

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

Fung, S C Kong, Y C y Lam, D M K (1982) Prenatal development of GABAergic, glycinergic and dopaminergic neurons in the rabbit retina. J Neurosci 2:1623-1632.

Gomez, J Zafra, F Olivares, L. Giménez, C y C. Aragón (1995) Regulation by phorbol esters of the glycine transporter (GLYT1) in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1233:41-46.

Grun G (1982) The development of the vertebrate retina: comparative survey. Springer-verlag, Berlin. pp98-215.

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

Guastella J, Nelson H, Czyzyk L, Keyna S, Miedel M, Davidson N, Lester H A y B Kanner (1990) Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science.* 249:1303-1306.

Guastella J, Brecha N, Weigmann C, Lester H A y N Davison (1992) Cloning, expression and localitation of rat brain high-affinity glycine transporter *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:7189-7193.

Johnson G A R y Iversen, L. L. (1971) Glycine uptake in rat central nervous system slices and homogenates: evidence for different uptake systems in spinal cord and cerebral cortex. *J. Neurochem.* 18: 1951-1961.

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

Jursky F y Nelson N (1996) Developmental expression of the glycine transporters GLYT1 y GLYT2 in mouse brain. *J Neurochem* 67:366-344

Kanner B Y (1994) Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. *J Exp Biol* 196:237-249.

Kuhar M y Zarbin M A (1978) Synaptosomal transport: a chloride dependence for choline, GABA, glycine and several other compounds. *J Neurochem* 31:251-256.

Liu Q R, Nelson H, M;andiyar S López-Corcuera B, y N Nelson (1992). Cloning and expression of a glycine transporter from mouse brain. *FEBS Lett* 305:110-114.

Liu Q R, Nelson H, M;andiyar S López-Corcuera B, y N Nelson (1993) Cloning and expression of a spinal cord -and brain -specific transporter with novel structures features. *J Biol Chem* 268:802-808.

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 tissues. *Brain Res.* 42:413-431.

López-Colomé A M, Tapia R, Salceda R. y H Pasantes-Morales (1978a) K⁺-Stimulated release of labeled γ -aminobutyrate, glycine and taurine in slices of several regions of rat central nervous system. *Neurosci* 3:1069-1074.

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

Lowry O H, Roserbrough N J, Far A L y Randed R (1951) Protein measurement with the folin 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*. Vol I., CRC Press, Inc., Florida. Pp 119-158.

Marc R E (1986). The development of retinal networks. En: Adler, R. and Farber, D. (Eds.). *The retina a model for cell biology studies parte I*. Academic Press., Inc. Orland. 17-65 pp.

Marc R R y D M E Lam (1981) Glycinergic pathway in the gold fish retina. *J Neurosci* 1:152-165.

Marshall J y M J Voaden (1976) Further observations on the uptake of ^3H -glycine by the isolated retina of the frog. *Exp Eye Res* 22:189-191.

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.

Neal M J y H Pickles (1969) Uptake of ^{14}C -Glycine by spinal cord. *Nature* 223:679.

Negishi K, y B D Drujan (1979) Effects of some amino acids on horizontal cells and the fish retina. *J Neurosci Res* 4:351-363.

Nelson N y H Lill (1994) Porters and neurotransmitters transporters. *J Exp Biol* 196:213-228.

Osawa Y, Saito N, Koga T, y C Tanaka (1994) Phorbol ester-induced inhibition of GABA uptake by synaptosomes and by *Xenopus* oocytes expressing GABA transporter (GAT1). *Neurosci Res.* 19:287-293.

Pérez-León J A Salceda R (1995) Different specific binding sites of ^3H glycine and ^3H strichnine in synaptosomal membranes isolated from retina. *Neurochem Res.* 20(8):915-922

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, Newyork, pp:355-390.

Rudnick G y Clark J. (1993) From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim Biophys Acta* 114:249-263.

Rayborn M E, Sarthy P V, Hollyfield J G y D M K Lam. (1981) The emergence, localization and maturation of neurotransmitter systems during development of the retina in *Xenopus laevis*: II Glycine. *J. Comp. Neurol.* 195:585-594.

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

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

Smith K E Borden L A Wang C H Hartling P R Branchek T y R L Weinsank (1992) Cloning and expression of a high-affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol* 45:573-469.

Stone S y P Witkowsky (1984) The actions of GABA, glycine and their antagonists on horizontal cells of the *Xenopus* retina. *J Physiol* 353:249-264.

Thompson W J (1991) Cyclic nucleotide phosphodiesterase: pharmacology, biochemistry and function. *Pharmac Ther* 51: 13-33.

Voaden M J, Marshall J y Murani N (1974) The uptake of (3H) γ -aminobutyric acid and (3H) glycine by the isolated retina of the frog. *Brain Res* 67: 115-118.

Werman R (1966). Criterios for identification of a central Nervous System transmitter. *Comp Biochem Physiol.* 18:745-766.

Worral D M y D C Williams (1994) Sodium ion-dependent transporter for neurotransmitters: a review of recent developments. *Biochem J* 297:425-436

Wu, S. M., y J. E. Dowling. (1980). Effects of GABA And Glycine on the distal cells of the cyprinid retina. *Brain Res.* 199:401-414

Zafra F., Aragon C, Olivares L, Danbolt C, Giménez C, y J S Mathisen (1995)
Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. J
Neurosci 15:3952-3969.