

03062

4
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
PROYECTO DE LICENCIATURA, MAESTRIA Y DOCTORADO
EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

LA NEUROTRANSMISION GLICINERGICA EN LA
RETINA DE LA RANA: UN ESTUDIO
INMUNOHISTOQUIMICO Y AUTORRADIOGRAFICO

T E S I S
QUE PRESENTA EL
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
JORGE ALBERTO PEREZ LEON
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

ENERO DE 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

269975



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.

PASINACION

DISCONTINUA.

Esta Tesis se desarrolló en el laboratorio y bajo la dirección de la doctora Rocío Salceda Sacanelles, del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

El manuscrito presente se revisó por el Jurado integrado por los investigadores:

**Dr. Ricardo Tapia
Dra Rocío Salceda Sacanelles
Dr Jesús García Colunga
Dr Miguel Morales
Dr José Segovia
Dr Mauricio Díaz Muñoz
Dr Jesús Adolfo García Sainz**

quienes con sus comentarios y sugerencias mejoraron la calidad de este trabajo

El autor recibió becas y apoyo económico de la Dirección de Asuntos del Personal Académico y de la Dirección General de Estudios de Posgrados de la UNAM y del Sistema Nacional de Investigadores del CONACyT.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Armando Gómez y Ricardo Tapia por la asesoría recibida durante los experimentos que forman parte de esta tesis.

Al Dr Jesús Calderón Tinoco y a la QBP Martha Morales Méndez, del CINVESTAV, por la enseñanza de la técnica de inamotransferencia.

Al personal de la Unidad de Cómputo del IFC de la UNAM.

A Jenny Magallán, Dominga Vera, Lupita Ramírez y Maru Galarza, por su apoyo durante los trámites de las becas, la asistencia a los congresos y las inscripciones a los cursos.

Quiero agradecer a varias personas que colaboraron al buen término de este proyecto de investigación, pero cuya influencia es todavía más duradera y significativa que un logro académico, pues me han brindado la oportunidad de contar con su amistad:

Doña Natalia Aguilar, Nati, gracias por su ayuda en los experimentos, por sus atenciones y su afecto

Profesores Rodolfo Paredes y Jorge Sepúlveda, por su asesoría en el trabajo fotográfico y, fundamentalmente, la sociología del trabajo de investigación.

Dr Jesús Manuel León Cázares, ejemplo de dedicación a la docencia, quien representó e intercedió por muchas generaciones de estudiantes de posgrado del IFC

Dr Diego González-Halphen, gracias Diego por tu confianza y disposición a escuchar a los estudiantes.

Incluso en estos tiempos, veloces como un cadillac sin frenos...

...las sombras son esquivas, de nada vale perseguirlas, pues ellas se sientan a la orilla de la chimenea, a esperar...

RESUMEN

La retina, órgano primario de la visión, ha sido objeto de estudio desde las últimas décadas del siglo anterior. Debido a su accesibilidad y su organización histológica, este tejido se ha utilizado también como un modelo en la investigación de la neurobiología sináptica. En la retina se han descrito los mismos sistemas de neurotransmisión que en el resto del sistema nervioso central, con algunas particularidades relevantes. La retina de los anfibios es fisiológicamente más compleja que la de los mamíferos, por lo que su estudio es aún más motivante. En este trabajo estudiamos al receptor postsináptico de la glicina en la retina de la rana, inicialmente mediante la unión de alta afinidad de ligandos radioactivos. A partir de estos experimentos se dedujo la presencia del receptor típico de glicina (modelado a partir de la médula espinal de los mamíferos), así como la presencia de sitios de unión diferentes a este receptor o al sitio de glicina asociado al receptor tipo NMDA de aminoácidos excitadores. Posteriormente, mediante inmunohistoquímica con los anticuerpos monoclonales mAb 7a y mAb 4a se localizó al receptor de glicina en las regiones sinápticas de la retina, y en experimentos paralelos con los anticuerpos policlonales Ab 384 y Ab RGly, dirigidos contra la subunidad α del receptor de glicina, se localizó a ésta también en las regiones sinápticas y además en las células de Müller, la glía predominante en la retina. El resultado se confirmó por experimentos con células aisladas. En conjunto, nuestros datos revelan que en la retina de la rana coexisten el clásico receptor postsináptico de glicina y una isoforma atípica, la que se localiza en las regiones sinápticas de la retina y sobre las células de Müller.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis tiene como capítulo inicial una Introducción en donde se exponen las características generales de la retina, tanto en su organización histológica como en su función. En la Introducción se incluyen los artículos de revisión titulados

“El receptor postsináptico de glicina” Pérez-León y Salceda, Ciencia, 47:177-189, 1996, que describe al receptor de glicina, y “La neurotransmisión glicinérgica en la retina de los vertebrados”, Pérez-León y Salceda, Boletín de Educación Bioquímica, 16:140-146, 1997, que expone la literatura referente al papel de la glicina en la retina.

Dentro del capítulo de la Introducción, en la sección de antecedentes, se resumen los datos a partir de los cuales se planteó el tema de investigación de la presente tesis. En esta misma sección se incluye el artículo “Different specific binding sites of ^3H -Glycine and ^3H -Strychnine in synaptosomal membranes isolated from frog retina”, Pérez-León y Salceda (1995), Neurochemical Research, 20:915-922, que es la versión publicada de los datos antecedentes.

En el capítulo Método Experimental se describen *in extenso* los experimentos que forman parte del trabajo de tesis. Los experimentos incluyen:

Unión de ligandos radioactivos en membranas sinaptosomales de la retina de la rana

Inmunotransferencia de membranas sinaptosomales de la retina de la rana

Inmunohistoquímica en cortes verticales de la retina

Inmunocitoquímica de células gliales de Müller aisladas de la retina

Los Resultados describen los datos obtenidos a partir de tales experimentos. Además incluyen al manuscrito “Immunohistochemical localization of the glycine receptor in synaptic layers and glial cells of the retina”, Pérez-León y Salceda, 1998. Este manuscrito fue aceptado para publicarse en la revista con comité editorial Primary Sensory Neuron.

Finalmente, quiero aclarar que el título de la tesis no corresponde exactamente con su contenido, ya que no presento ningún experimento con la técnica autorradiográfica, este error, que no pudo corregirse debido a impedimentos de tipo administrativo, es completa responsabilidad mía.

Jorge Alberto Pérez-León.

INDICE

Introducción	
La Retina	1
La glicina como neurotransmisor en la retina	2
El Receptor Postsináptico de la glicina	4
La neurotransmisión glicinérgica en la retina de los vertebrados	5
Antecedentes	6
Anexo: Different specific binding sites of 3H-Glycine and 3H-Strychnine in synaptosomal membranes isolated from frog retina	7
Objetivos	8
Método Experimental	
Ensayos de Unión específica	9
Inmunohistoquímica	11
Resultados	
Ensayos de unión específica	15
Inmunotransferencia	17
Inmunohistoquímica	19
Immunohistochemical localization of glycine receptor in synaptic layers and glial cells of frog retina	20
Inmunocitoquímica de células de Müller aisladas de la retina de la rana	22
Discusión General	
Unión de ligandos radioactivos	25
Inmunohistoquímica	29
La transmisión glicinérgica en la retina de <i>Rana pipiens</i>	31
Referencias	33

Lista de abreviaturas

Ab384, anticuerpo policlonal dirigido contra la secuencia de aminoácidos 384 al 391 de la subunidad α del receptor postsináptico de glicina

AbRGly, anticuerpo policlonal dirigido contra el receptor de glicina purificado de la médula espinal de la rata

CNE, capa nuclear externa de la retina

CNI, capa nuclear interna

CPE, capa plexiforme externa

CPI, capa plexiforme interna

GCL, capa de células ganglionares

mAb, anticuerpo monoclonal

RGly, receptor postsináptico de la glicina

ROS, segmentos externos de los fotorreceptores

LA NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA EN LA RETINA DE LA RANA: UN ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO Y AUTORADIOGRÁFICO

INTRODUCCIÓN

La Retina

La retina es el tejido dentro del cual la luz se transforma en los impulsos nerviosos que dan origen a la percepción visual. Pese a la diversidad entre los vertebrados, todas las clases de este *phylum* presentan la misma organización histológica en la retina. Los somas de los fotorreceptores forman la capa nuclear externa y los somas de las interneuronas la capa nuclear interna. Las sinapsis entre los fotorreceptores y las interneuronas se establecen en la capa plexiforme externa, mientras que las sinapsis entre estas interneuronas y las células ganglionares se encuentran en la capa plexiforme interna. Los axones de las células ganglionares forman la fibra óptica la cual, al salir de la retina, se cubre de mielina, transformándose en el nervio óptico, por el que se transmite la información al encéfalo.

Los fotorreceptores, por medio de la fototransducción, generan y transmiten una señal hacia dos tipos de interneuronas, las células bipolares y las células horizontales. Los fotorreceptores, encargados de iniciar la transmisión visual, son las células de primer orden dentro de la retina. Las células bipolares y horizontales, que son interneuronas retinianas de segundo orden, transforman la señal transmitida por el fotorreceptor; por un lado, las células horizontales establecen sinapsis recíprocas con los fotorreceptores, mientras que las células bipolares usan dos vías alternas en la capa plexiforme interna (Wässle y Boycott, 1991).

Dentro de la capa plexiforme interna las células bipolares conectan sinápticamente con las células ganglionares, o utilizan alternativamente una neurona intermedia, que es la célula amacrina. La célula amacrina finaliza el flujo de información intrarretiniano haciendo sinapsis con una célula ganglionar. En virtud de que las células bipolares transmiten el impulso a las células amacrinas y ganglionares, se les ha denominado a estos dos últimos tipos neuronales como interneuronas retinianas de tercer orden. Hay otro tipo de neurona que recibe información de la célula bipolar, ésta es la célula interplexiforme, con prolongaciones en ambas capas plexiformes y que, junto con las células horizontales, es un elemento de retroalimentación sináptica de la capa plexiforme externa (Wässle y Boycott, 1991, figura 1B de Pérez-León y Salceda, 1997, Boletín de Educación Bioquímica).

Los fotorreceptores se presentan en dos tipos principales: los conos, que contienen pigmentos sensibles a longitudes de onda restringidas, y los bastones, cuyo pigmento fotosensible es la rodopsina, sensible a un intervalo amplio de longitudes de onda. Diversos estudios, histológicos y electrofisiológicos, han demostrado que el impulso nervioso generado en los conos se transmite directamente de las células bipolares y por éstas a las células ganglionares. En cambio, la señal nerviosa originada en los bastones se transmite a las células bipolares de bastones y de ellas a las células amacrinas, las que finalmente tienen contacto sináptico con las células ganglionares por sinapsis químicas, o con las células bipolares de conos, por medio de sinapsis eléctricas. Las células amacrinas que participan en esta vía son las células amacrinas AII, además existen otros tipos de células amacrinas que participan en la transmisión lateral dentro de la capa plexiforme interna (Wässle y Boycott, 1991).

Las neuronas retinianas funcionan con base en campos receptivos circulares, lo que significa que responden a los cambios en el estado de iluminación en el área retiniana a su alrededor, en forma de encendido o apagado (ON/OFF, Wässle y Boycott, 1991).

La retina de los anfibios presenta además otra clase de respuestas, las que están relacionadas con los estímulos luminosos que tienen una orientación definida y, por lo tanto, implican la detección de una dirección definida (Voaden, 1976). A las células que responden así se les denomina células selectivas a la dirección, entre ellas se encuentran algunas células amacrinas y ganglionares (Voaden, 1976). Las respuestas de estas células de los anfibios se comparan sólo con las que pueden registrarse de las neuronas de la corteza cerebral de los mamíferos y, si se recuerda que la retina de todos los vertebrados es histológicamente semejante, esto indica que, dentro de la retina de los anfibios, hay algunas interacciones más complejas entre las diferentes neuronas que las que pueden ocurrir en la retina de los mamíferos.

La Glicina como neurotransmisor en la retina

Una de las razones por la que dos tejidos con los mismos tipos neuronales sean funcionalmente diferentes, como ocurre entre las retinas de los mamíferos y los anfibios, puede ser la existencia de diferentes tipos de comunicación neuronal, ya sea mediante la actividad de diferentes neurotransmisores, o de los mismos con diversas acciones. Por ejemplo, en la retina de los mamíferos la glicina es el neurotransmisor en diversas sinapsis de la capa plexiforme interna, pero su efecto no se ha detectado en la capa plexiforme externa; por el contrario, en los anfibios la

actividad de la glicina como neurotransmisor se ha registrado tanto en sinapsis de la capa plexiforme interna como de la capa plexiforme externa (Marc, 1985).

Aun cuando se tienen evidencias experimentales de la actividad de la glicina como neurotransmisor en la retina de los anfibios, hay lagunas respecto a los receptores que median la acción de este aminoácido, así como de la identificación de las neuronas retinianas que utilizan a la glicina como neurotransmisor (Pourcho y Goebel, 1990). En los siguientes artículos de revisión se expondrán las características del receptor postsináptico de la glicina y de la participación de este aminoácido en la neurotransmisión intrarretiniana.

Pérez-León y Salceda (1996) El receptor postsináptico de la glicina. Ciencia, 47:177-189.

Fe de errata: en el pie de la figura 1 se lee "...la unión de estriknina es irreversible", la frase correcta es : "*...la unión de estriknina es reversible*".

El receptor post-sináptico de glicina

Jorge Alberto Pérez León

y

Rocío Salceda Sacanelles

RESUMEN

La glicina es el neurotransmisor inhibitorio de la médula espinal de los mamíferos, en donde actúa abriendo un canal de cloruro que puede antagonizarse por el alcaloide estricnina. La interacción de la glicina y de la estricnina sobre el receptor post-sináptico de la glicina (RGly), es uno de los mejores ejemplos de especificidad entre agonista y antagonista, así como tam-

bién, de cuales son las estrategias de investigación que se siguen para esclarecer la identidad de un transmisor y las características de su receptor. En este trabajo se exponen los datos más relevantes respecto a la forma en que se ha aprovechado la relación glicina-estricnina para hacer del RGly uno de los receptores mejor conocidos al nivel electrofisiológico, bioquímico y genético.

INTRODUCCIÓN

El papel transmisor de la glicina en el sistema nervioso central de los vertebrados está bien establecido y, junto con la acetilcolina (Ac) y los aminoácidos glutámico (Glu) y γ -amino butírico (GABA), constituye el paradigma de los transmisores que abren canales iónicos. El trabajo que dilucidó el carácter de la glicina como neurotransmisor requirió la convergencia de técnicas histológicas, bioquímicas y fisiológicas, lo que ha llevado al conocimiento detallado de la acción de la glicina sobre las membranas excitables y de los eventos iónicos que provoca, de la farmacología de su actividad y del receptor postsináptico que media su acción.

Las primeras investigaciones dirigidas *ex profeso* a evaluar la función de la glicina como transmisor fueron emprendidas por el grupo encabezado por MH Aprison, en los Estados Unidos, el que, con el uso de la médula espinal del gato como preparación experimental, demostró que la glicina se encuentra en concentraciones elevadas en la materia gris dorsal y ventral de

Recibido el 25 de agosto de 1995

Aceptado el 20 de mayo de 1996

Rocío Salceda Sacanelles Es Investigadora Titular de tiempo completo del Depto. de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde estudió en la Facultad de Ciencias la Licenciatura en Biología, la Maestría y el Doctorado en Ciencias. Realizó una estancia postdoctoral en el Depto. de Bioquímica de la Universidad Católica de Nijmegen, Holanda. Es Investigador Nacional y miembro de las Sociedades Científicas: Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Mexicana de Bioquímica, Society for Neuroscience, Association for Research in Vision and Ophthalmology, International Eye Research, American Society for Cell Biology y Mexicana de Historia Natural y Profesor en la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Jorge Alberto Pérez León Se formó biólogo por la Facultad de Ciencias de la UNAM, maestro en Investigación Biomédica Básica por la Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del CCH de la UNAM y actualmente es estudiante de doctorado de la misma y socio estudiante de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Labora como profesor de la Facultad de Ciencias, UNAM; es becario de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM y candidato a investigador nacional del Sistema Nacional de Investigadores.

este tejido, así como que los niveles se abaten debido a la lesión selectiva de las interneuronas espinales (Davidoff y col, 1967).

Más adelante, el mismo grupo demostró que la aplicación iontoforética de la glicina sobre las motoneuronas espinales hiperpolariza a éstas, de la misma forma en que lo hace la estimulación de las interneuronas presinápticas *in situ* (Werman y col, 1967) y este resultado, así como el referente a los niveles endógenos de glicina, sugirió que la glicina era el transmisor natural de las interneuronas espinales. Como marco teórico de esta línea de trabajo, Werman y Aprison (1968) postularon que, para demostrar que una molécula es un neurotransmisor, se requiere la conjunción de datos que cubran tres aspectos: el neuroquímico, o sea, la localización del supuesto neurotransmisor y de las enzimas de su metabolismo; el neurofisiológico, que consiste en la equivalencia de los efectos electrofisiológicos sobre la membrana sináptica del transmisor natural y del propuesto, y el neuroquímico-fisiológico, que se cubre al demostrar la liberación del neurotransmisor de la terminal presináptica como respuesta a su estimulación.

Para demostrar que la glicina funciona como neurotransmisor en la médula espinal, rigiéndose por los criterios delineados arriba, el grupo realizó una serie de trabajos en los que las interneuronas espinales de la médula del gato fueron la preparación protagonista y, con el apoyo de evidencia ulterior, de carácter neurofarmacológico y neuroanatómico, corroboraron la noción inicial de que la glicina es uno de los neurotransmisores dentro de la médula espinal (Aprison, 1990).

La investigación sobre la transmisión glicinérgica ha desembocado en la caracterización minuciosa del receptor post-sináptico que media su acción, el cual es uno de los representantes arquetípicos del grupo de los receptores ionotrópicos; en este trabajo se delineará el estudio experimental que condujo a este conocimiento.

I. CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS DEL RECEPTOR POST-SINÁPTICO DE LA GLICINA

La acción de la glicina sobre las membranas postsinápticas consiste en activar una co-

rriente de iones Cl^- (Fig 1). Los iones Cl^- permean hacia el interior de la neurona si el potencial de equilibrio del Cl^- (E_{Cl}) es negativo con respecto al potencial eléctrico de la membrana en reposo (V_m), o hacia afuera, en el caso de que E_{Cl} sea positivo. En el primer caso, la membrana postsináptica se hiperpolariza y la actividad de la neurona se inhibe, y en el segundo, se despolariza, con lo que la neurona aumenta su actividad espontánea.

El efecto de la glicina sobre las neuronas postsinápticas se media por el receptor postsináptico de glicina (RGly). Los estudios sobre el RGly en los que se ha comparado la corriente del receptor contra el valor de V_m , en el cual ésta cambia de dirección (el potencial de inversión, que se calcula mediante la ecuación de Hodgkin-Goldman-Katz), han definido un orden de permeabilidad $SCN^+ > I^+ > Br^- > Cl^- > F^-$ (Bormann, 1990) y también han determinado el orden de conductancia: $Cl^- > Br^- > I^+ > SCN^+ > F^-$. Las secuencias de permeabilidad y de conductancia están invertidas entre sí, lo que significa que los iones se unen a sitios determinados dentro del canal que forma el receptor, es decir, que no se mueven en un medio acuoso al atravesarlo (Bormann, 1990).

Desde las primeras caracterizaciones de la transmisión sináptica en la médula, un resultado consistente fue el antagonismo de la estricnina, tanto contra la acción del transmisor natural, como de la glicina aplicada iontoforéticamente (Curtis y col, 1971). Se dedujo entonces que la glicina como agonista y la estricnina como antagonista actúan sobre la misma proteína, es decir, sobre el RGly; de hecho, el antagonismo de la estricnina en contra de la glicina, es el criterio farmacológico al que se recurre con mayor frecuencia para proponer que una respuesta electrofisiológica es provocada por la glicina. De esta forma, todos los datos que se describen a continuación son atribuidos al RGly, precisamente por ser antagonizados por la estricnina. Con la técnica de parche de membrana ("patch-clamp"), aplicada a neuronas cultivadas del ganglio del asta dorsal de la médula de la rata (DRG), se determinó el valor de la conductancia principal del RGly en 46 picoSiemens, con varios subestados en el intervalo de 12 a 46 pico Siemens (Bormann, 1990). Los estudios de Bormann y colaboradores (1987) en las neuronas DRG, bajo condiciones de variación de la relación molar

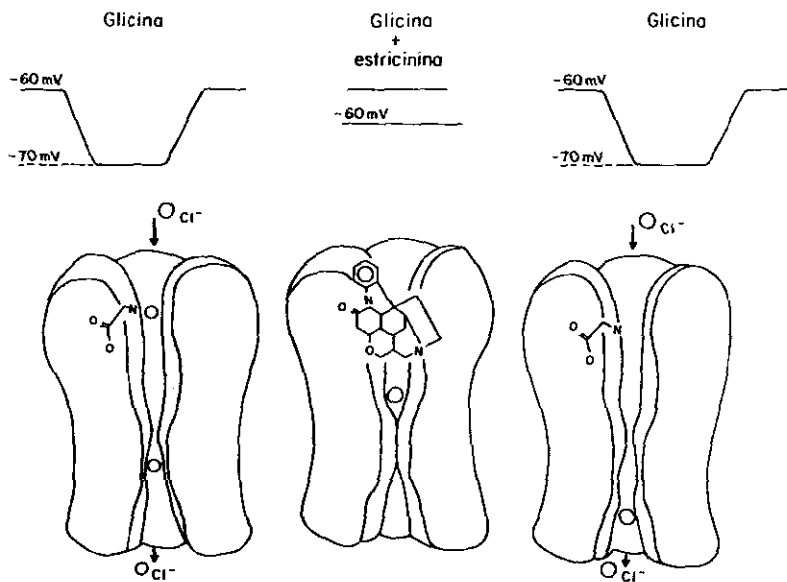


Fig 1 La glicina actúa sobre las membranas postsinápticas abriendo un canal proteico selectivo al Cl⁻, la figura muestra un esquema ideal de la forma en que se abre ese canal de Cl⁻ al unirse la glicina y cómo, en una neurona hipotética, la entrada del Cl⁻ (V_m) hasta un estado hiperpolarizado. Cuando se aplican glicina y estricnina, este alcaloide bloquea a la glicina y el canal permanece cerrado, sin que se registre un cambio en V_m , pero la unión de estricnina es irreversible y, al aplicarse la glicina en ausencia de estricnina, el canal puede abrirse de nuevo.

SCN⁻/Cl⁻, demostraron que la conductancia no disminuye monóticamente 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. Por ejemplo, la aplicación de la glicina 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 el canal del RGly pasa por varios estados abiertos y varios estados cerrados y concuerda con los diversos subestados de conductancia (Bormann, 1990).

Sakmann y sus colaboradores (1982, 1983) han demostrado que la corriente al pico, registrada mediante fijación de voltaje ("voltage-

clamp"), aumenta proporcionalmente con el cuadrado de la concentración de glicina administrada, un indicio de 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 la glicina en las neuronas aisladas del telencéfalo, con lo que demostraron que las respuestas electrofisiológicas provocadas por la glicina también se producen con L-serina, L-alanina, D-alanina, β-alanina y taurina, pero no con GABA. Por otra parte, del mismo trabajo se concluyó que los aminoácidos que provocan respuestas electrofisiológicas en el RGly son también capaces de desensibilizar de manera cruzada al receptor y, a partir de estos datos y del análisis de la estructura de los aminoácidos utilizados, se ha propuesto que la unión de la glicina a su receptor se realiza por la interacción de sus grupos

NH₂ y COO⁻ en dos sitios diferentes y la unión, por puentes de hidrógeno, a un tercer sitio que impone restricciones alostéricas y tiene una localización asimétrica dentro del receptor (Tokutomi y col, 1989).

Más tarde, Takahashi y Momiya (1991) demostraron que el RGly, en rebanadas de la médula espinal de la rata, presenta varios estados de conductancia, así como las mismas cinéticas de apertura y de cierre que presentan las neuronas en cultivo y las neuronas aisladas. Además, el registro de las corrientes del RGly en el soma y en las dendritas de las neuronas medulares fue igual entre los sitios sinápticos y extrasinápticos, todo lo cual sugiere que las propiedades electrofisiológicas del RGly, descritas hasta entonces en preparaciones de neuronas aisladas, parecen reproducirse *in situ*.

II. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL RECEPTOR DE GLICINA

A pesar de 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 ligandos radioactivos; por otra parte, el RGly fue de los primeros receptores de aminoácidos que logró ser aislado y analizado en cuanto a la composición de subunidades proteicas, lo que ha llevado al conocimiento de las proteínas que conforman al RGly y de los genes que las codifican. Para dichos fines, la estricnina, extraída de la planta india *Strychnos nuxvomica*, ha sido la herramienta más importante, puesto que, como se mencionó arriba, parece ser que no existe ligando más específico para el RGly.

A. Características de la unión de estricnina-³H

La estricnina radioactiva (estricnina-³H) se utilizó por vez primera por Young y Snyder (1973) para medir la cinética de unión a las membranas de sinaptosomas obtenidos de la médula espinal y de la médula oblongada de la rata. La unión de estricnina-³H resultó saturable y de alta afini-

dad, características que la asociaron con una proteína de membrana, aunque lo más importante fue la evidencia de que la unión de estricnina-³H se inhibió por la glicina, así como por la β-alanina y la taurina, dos aminoácidos que provocan las mismas respuestas electrofisiológicas que la glicina. Estos datos indicaron que la estricnina-³H se une al RGly, corroborando los resultados electrofisiológicos.

Young y Snyder (1974a) demostraron que el desplazamiento de una molécula de estricnina-³H se efectúa por dos moléculas de glicina, así que propusieron que la interacción de estas moléculas ocurre por efectos alostéricos sobre la misma proteína. Posteriormente, los mismos investigadores demostraron el desplazamiento de estricnina-³H por Cl⁻ y por una serie de iones halogenuros (Br⁻, I⁻, F⁻), y orgánicos (SCN⁻, HCOO⁻, CH₃COO⁻), con potencia y eficacia muy similares a las que tuvieron para invertir al potencial post-sináptico inhibitorio en las motoneuronas espinales (Young y Snyder, 1974b). La inhibición de la unión de estricnina-³H por estos aniones sugirió que el alcaloide se une al RGly en una región que participa en la conductancia iónica (Young y Snyder, 1974b).

La evidencia descrita resultó tan contundente para considerar a la estricnina como el ligando más específico y afín por el RGly, que se convirtió en la única molécula radioactiva utilizada para caracterizarlo, de manera que, el análisis cinético y farmacológico del RGly se restringió al estudio de la unión de estricnina-³H.

La unión específica de la estricnina-³H se midió también en el sistema nervioso central de la rana, en donde se encontró que coincide en localización con los sitios de transporte de alta afinidad de glicina radioactiva (glicina-³H) (Müller y Snyder, 1978). La estricnina-³H también se utilizó para estudiar al RGly en la retina de los bovinos (Borbe y col, 1981) y de la rata (Schaeffer y Anderson, 1980). En cada caso, la unión de estricnina-³H se inhibió con el siguiente orden de potencia: glicina > β-alanina > taurina, y esta secuencia se consideró como una de las características diagnósticas del RGly.

La unión específica de estricnina-³H ha permitido inferir cómo se une la glicina a su receptor. Por ejemplo, Marvizón y colaboradores (1986) demostraron, en membranas sinaptosomales de la médula de la rata, que la interacción

estricnina-glicina es alostérica, como se sugirió inicialmente (Young y Snyder, 1974a). Por otra parte, introdujeron el uso de otros ligandos, como los derivados de estricnina (2-amino-estricnina, nitro-estricnina, etc) para competir por el sitio de unión de estricnina, y los derivados del esteroide 5, 6, 7, 8 tetrahidro-4H-isoxazol[4,5-d]azepin-3-ol (THAZ) para competir por el sitio de glicina (Marvizón y col, 1986).

El mismo grupo amplió y fundamentó la idea de dos sitios diferentes para la unión del agonista y del antagonista, al demostrar que los aniones Cl^- , Br^- , I^- , SO_4^{2-} , y HCO_3^- regulan a la unión de estricnina de forma negativa y favorecen la unión de glicina (Marvizón y col, 1986), además de que encontraron que la unión de cada tipo de ligando muestra diferente dependencia de la temperatura: la unión de los antagonistas (estricnina y sus derivados, el RU 5135) 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 y col, 1989a). Quizá esto pueda explicar por qué los agonistas abren el canal de Cl^- y por qué los antagonistas lo cierran.

Además de la β -alanina, la taurina, la L-serina y los derivados del THAZ, existen pocas moléculas que sean inhibidores efectivos de la unión de estricnina- ^3H . En un intento reciente por ampliar esta serie, Johnson y sus colaboradores (1992) probaron, en las membranas sinaptosomales de la médula de la rata, diversos análogos sintéticos de la L-prolina en el desplazamiento de estricnina- ^3H , entre los cuales encontraron que la 3-carboxi-3, 4 deshidroxi-pirrolidina presentó la misma potencia que la glicina para inhibir la unión de estricnina- ^3H ($\text{IC}_{50} = 8 \mu\text{M}$), aunque esta molécula provocó respuestas electrofisiológicas muy pobres sobre el RGly, lo que apoya, de nuevo, que los sitios de reconocimiento del agonista y del antagonista no son los mismos (Johnson y col, 1992).

B. Aislamiento y purificación del RGly

La disponibilidad de la estricnina como el ligando más afín por el RGly (K_D de alrededor 4-8 nM) permitió el uso de este alcaloide para la purificación del complejo proteico. El primer paso

fue dado por Pfeiffer y Betz (1981), que solubilizaron con Tritón X-100 al RGly de la médula espinal de la rata y, al unir covalentemente la estricnina- ^3H con el receptor solubilizado, marcaron una banda de 48 kDa en geles de poli-acrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS) (Graham y col, 1981). A partir del receptor solubilizado, Pfeiffer y sus colaboradores (1982) aislaron al RGly mediante el uso de la 2-amino-estricnina acoplada a columnas de sefarsosa. En este trabajo, que fue el inicial en cuanto al análisis de la composición del receptor, se reportó por vez primera la existencia de tres proteínas como las constituyentes: de 48, 58 y 93 kDa, y mediante el análisis de sedimentación en gradiente de sacarosa, se calculó la masa total del receptor en 246 kDa (Pfeiffer y col, 1982).

El receptor purificado se utilizó para generar anticuerpos monoclonales, de entre los cuales los más sobresalientes son los denominados mAb 4a y mAb 7a, que reconocen a la subunidad de 48 kDa y de 58 kDa (4a) y de 93 kDa (7a) (Pfeiffer y col, 1984). El reconocimiento cruzado indica que los diferentes polipéptidos del receptor son homólogos entre sí.

Más tarde, se descubrió que el RGly aislado y purificado de la médula espinal del cerdo comparte la composición polipeptídica y la reactividad inmunológica con el RGly de la rata (Graham y col, 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 hecho, junto con la localización del antígeno reconocido por el anticuerpo 7a, siempre sobre la cara citoplásmica de la membrana (Triller y col, 1985; Altschuler y col, 1986), establecieron las bases para considerar que la proteína de 93 kDa es periférica e intracitoplásmica, y que las de 48 y 58 kDa son proteínas integrales de la membrana.

La topografía del receptor de glicina terminó de 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 y col, 1990). Ya que la proteína de 48 kDa siempre fue la más abundante en estas preparaciones, y de acuerdo con la masa total del receptor (246 kDa), se propuso un modelo en el cual el RGly es un pentámero de tres subunidades de 48 y dos de 58

kDa, con la asociación periférica de la de 93 kDa sobre la cara citoplásmica de la membrana (Fig 2) (Langosch y col, 1990).

C. Reconstitución del RGly

En 1989 se reconstituyó al RGly de la médula espinal de la rata en liposomas de fosfatidilcolina (García-Calvo y col, 1989), preparación bajo la cual se demostró una corriente de Cl^- en respuesta a la estimulación con glicina, así como la unión de estricnina- ^3H con el mismo perfil farmacológico que el RGly "nativo" (García Calvo y col, 1989).

El RGly reconstituido en vesículas de fosfolípidos se utilizó para localizar los sitios de unión de glicina y estricnina dentro de la subunidad de 48 kDa. Ruíz-Gómez y colaboradores (1989b), encontraron que, al modificar a los residuos de lisina, se aumenta la concentración de glicina que es necesaria para desplazar a la estricnina- ^3H , aunque la interacción mol a mol de estos ligandos se mantenga constante. Más adelante se demostró que la modificación de los residuos de tirosina reduce el número máximo de sitios de unión de estricnina- ^3H , sin alterar su afinidad y, por proteólisis de la subunidad, determinaron que estos residuos están en el fragmento que

comprende a los aminoácidos 171-220 (Ruiz-Gómez y col, 1990). Dicho fragmento se localiza extracelularmente y es equivalente al sitio de unión de los antagonistas en la subunidad α del receptor nicotínico de acetilcolina (Steinbach e Ifune, 1989; Vandenberg y col, 1992).

III. ANÁLISIS GÉNICO DEL RGly

A. La subunidad de 48 kDa: α

Los estudios de marcaje covalente de la subunidad de 48 kDa con estricnina- ^3H , demostraron que el marcaje puede prevenirse con glicina (Graham y col, 1981), así que esta subunidad incluye el sitio de unión del antagonista y el del agonista, como se deduce también de la evidencia expuesta más arriba. Por tal razón, y dado que se disponía entonces del receptor purificado, la subunidad de 48 kDa fue la primera del RGly que se sometió al análisis a nivel de los ácidos nucleicos. Grenningloh y colaboradores (1987) utilizaron varios fragmentos de esta subunidad para, a partir de su secuencia de aminoácidos, sintetizar oligonucleótidos y revisar las bibliotecas genómicas del sistema nervioso central de la rata. La estrategia les permitió aislar y clonar al gen que codifica a la subunidad de 48 kDa, a partir de entonces denominada α , del RGly de la médula de la rata. El gen codifica a una proteína de 421 residuos de aminoácidos, cuyo extremo aminoterminal es extracelular y que además, presenta un sitio de glucosilación en el residuo 38. El perfil de hidropatía de la proteína demostró que tiene cuatro segmentos transmembranales (secuencialmente M₁-M₄), entre los aminoácidos 220-246, 253-270, 285-308 y 393-410, los cuales podrían formar al canal de Cl^- del RGly.

La comparación entre este gen, así como de la proteína deducida, con la subunidad α del receptor nicotínico de acetilcolina (nACR) demostró que el 21% de los aminoácidos son idénticos y otro 22% tiene propiedades químicas similares (cambios conservativos), con lo que surgió la noción de que ambos receptores fueran homólogos. La idea se corroboró al encontrarse que los segmentos extracelulares comparten un par de cisteínas en las posiciones 140 y 154, las que pueden formar un puente disulfuro y así un asa que, se supone, permite la unión del ligando (Gren-

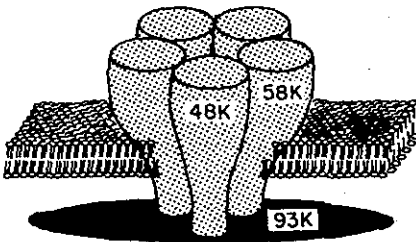


Fig 2 Esquema de la estructura oligomérica del RGly conforme se ha propuesto por Langosch y colaboradores (1990). Los sitios de reconocimiento del agonista y del antagonista se localizan sobre las subunidades de 48 kDa, mientras que se supone que la de 93 kDa funciona para anclar al receptor con el citoesqueleto neuronal (Kirsch y col, 1993), los detalles se discuten en el texto.

ningloh y col, 1987). Un reporte simultáneo sobre el receptor ionotrópico de GABA (GABAA) (Schofield y col, 1987) permitió deducir que las subunidades de los tres receptores mencionados son homólogas, y se obtuvo el primer indicio para considerar la existencia de una familia de receptores ionotrópicos. Se presenta un esquema de la subunidad α del receptor de glicina en la Fig 3.

Mediante la expresión heteróloga de las proteínas neuronales, la cual se realiza inyectando a los ovocitos de la rana *Xenopus* con los ARN mensajeros obtenidos de las neuronas, puede analizarse a los diversos receptores de neurotransmisores, aun cuando no se conozca la estructura del gen que los codifica. Con esta estrategia, Akagi y Miledi (1988) registraron las corrientes iónicas del RGly de la médula de la rata, cuyas características electrofisiológicas y farmacológicas les sugirieron la existencia de diversos isoformas de este receptor. La diversidad sugerida en este trabajo se confirmó al encontrarse diversas variantes génicas de la subunidad α del RGly, que se presentan tanto en la rata como en el humano (Grenningloh y col, 1990), y cuyas propiedades más relevantes se describen más adelante.

B. La subunidad de 58 kDa: β

Puesto que los sitios de unión de agonistas y antagonista del RGly se localizaron dentro de la subunidad α (Graham y col, 1981) y, dado que la expresión heteróloga del gen de ésta fue suficiente para generar receptores con características similares a las registradas *in situ* (Schmieden y col, 1989), se pensó que, además de incluir a los sitios de unión de los ligandos, la subunidad α constituye al canal de Cl^- del complejo. Sin embargo, Grenningloh y colaboradores (1990b) aislaron y clonaron al gen que codifica a la subunidad de 58 kDa, denominada β , y esta proteína, expresada en ovocitos de *Xenopus*, respondió a la estimulación con glicina generando una corriente de Cl^- sensible a estriquina. Este dato constituye una evidencia de que para formar al receptor *in situ* se requiere de la participación de ambas subunidades, además de que podrían encontrarse isoformas homólogas, es decir, sólo con subunidades α o sólo con subunidades β (Betz, 1991). La subunidad β pu-

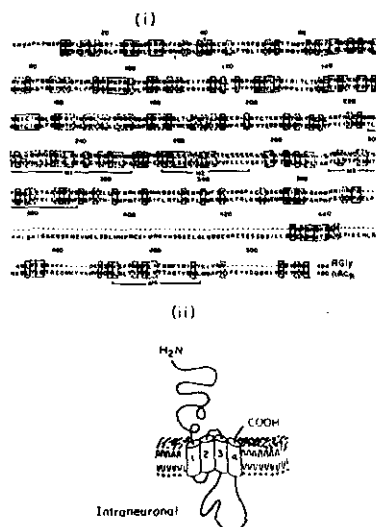


Fig 3 Secuencia de aminoácidos (i) y estructura esquemática de la subunidad α del RGly (ii). Los aminoácidos (a.a.) se simbolizan por el código de una letra, las secuencias subrayadas (M_1 - M_4) corresponden a las secuencias transmembranales probables. Se muestra también la secuencia de la subunidad α del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), para fines de comparación: los a.a. encerrados en líneas continuas son idénticos, en líneas discontinuas están las sustituciones conservativas y los triángulos marcan a los a.a. susceptibles de glicosilación. (ii) Esquema de la subunidad α del Rgly propuesto por Ruiz-Gómez y sus colaboradores (1990).

diera no ser exclusiva del RGly, ya que los sitios en los que se encuentra el ARN mensajero (ARNm) de esta proteína no coinciden totalmente con los sitios de unión específica de estriquina- 3H , ni con los sitios de expresión del ARNm de la subunidad α (Malosio y col, 1991); no obstante, no hay duda de que forma parte del receptor *in situ*, como se deduce de lo expuesto anteriormente y de datos que serán enumerados más adelante.

C. Experimentos de co-expresión heteróloga de las subunidades α y β

El análisis génico 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, secuencialmente α_1 , α_2 , α_3 , y dos variantes de la subunidad β (Langosch y col, 1990). Las variantes difieren en su localización temporal: α_1 en el adulto, α_2 en los neonatos y en 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_2 en el cerebro anterior y β en el resto del cerebro (Betz, 1991). Aun cuando estas subunidades difieren en su secuencia de aminoácidos, todas muestran alta afinidad en la unión de estrocinina- ^3H y su desplazamiento por glicina y otros agonistas, así como la capacidad para generar corrientes de Cl^- .

No obstante, el hallazgo más sorprendente ha sido el de una variante que activa una conductancia a Cl^- en respuesta a la glicina, sin que ésta pueda ser antagonizada por la estrocinina en concentración menor a $1 \mu\text{M}$ (Kuhse y col, 1990), lo cual resulta sorprendente si se considera que la afinidad del alcaloide por el resto de las subunidades se encuentra en el intervalo de concentración nanomolar. La subunidad, que se conoce como α_2^* , difiere con respecto a la α_2 en el aminoácido que ocupa la posición 167: α_2^* tiene un ácido glutámico en lugar de glicina. Mas que ser una quimera, el ARNm de la subunidad α_2^* es el más abundante en la médula espinal de la rata durante los primeros diez días postnatales, lo que quizá explica por qué los roedores neonatos son insensibles a la estrocinina (Betz, 1991).

Cuando se expresan en ovocitos de *Xenopus*, las variantes α_1 y α_2 difieren en su sensibilidad a los agonistas del RGly: los receptores formados solamente de variantes α_1 (homo-oligómeros α_1) se activan por la β -alanina y la taurina, mientras que los homo-oligómeros α_2 requieren que dichos aminoácidos se apliquen en concentraciones hasta 30 veces mayores que con las que responden los homo-oligómeros α_1 (Schmieden y col, 1992). Pese a que ambos tipos de variantes responden en el mismo intervalo de concentraciones de glicina, las corrientes generadas son siempre tres, o más veces, mayores en las variantes α_2 que en las α_1 , un indicio de que, aun cuando se conserven los mismos sitios de reconocimiento, la conductividad del canal puede ser diferente (Schmieden y col, 1992).

Los homo-oligómeros α presentan como característica particular el que son inhibidos por pi-

crotoxina (Schmieden y col, 1989; Sontheimer y col, 1989), un alcaloide que *in situ* bloquea a la corriente de Cl^- del receptor GABA_A, pero no la del RGly. En particular, este hecho sugiere que los homo-oligómeros adquieren características particulares que el RGly nativo no presenta, y como ejemplo está el aumento en la afinidad de los homo-oligómeros α_1 , cuando se expresan en alta densidad en ovocitos de *Xenopus* (Taleb y Betz, 1994); en este caso la afinidad por la glicina, la β -alanina y la taurina se aumenta entre 5 y 6 veces con respecto al RGly nativo, mientras que la sensibilidad a estrocinina se reduce en la misma medida.

La expresión heteróloga en la línea celular 293 (de riñón de humano), de cada una de las variantes α y de las diversas mutantes puntuales de ésta, demostró que el sitio de unión de estrocinina- ^3H incluye a los residuos de aminoácidos glicina 160, tirosina 161, lisina 200 y tirosina 202 (Vandenberg y col, 1992). Ya que, de acuerdo con la estructura deducida de la subunidad (Grenningloh y col, 1987), estos residuos se encuentran en una asa extracelular, y puesto que esta región es homóloga en las subunidades α de los receptores GABA_A y nAChR se ha propuesto que la región tiene una estructura terciaria común en los tres receptores (Vandenberg y col, 1992).

Schmieden y sus colaboradores han demostrado que, en la variante α_1 , los aminoácidos 111 y 212, que son una isoleucina y una alanina respectivamente, determinan la pobre sensibilidad a taurina, pues cuando éstos son sustituidos por valinas, la taurina produce respuestas electrofisiológicas con la misma potencia que la glicina (Schmieden y col, 1992). Por otra parte, también mediante expresión heteróloga, se sabe que los homo-oligómeros de cualquiera de las subunidades α forman canales con varios estados de conductancia. La conductancia más frecuente depende de qué aminoácido se encuentre 3 veces en la posición 121, dentro del segmento M2, y que es una glicina en las subunidades nativas α_2 (Bormann y col, 1993). Así, se sugiere que es el segmento M2 el que, con mayor probabilidad, forma el canal de Cl^- del RGly.

La subunidad β también forma receptores con diversos estados de conductancia, pero su conductancia es mucho menor con respecto a los homo-oligómeros α (Grenningloh y col, 1990b). Lo

que es más relevante, sin embargo, es que la subunidad β confiere la resistencia a picrotoxina, puesto que los hetero-oligómeros α/β no se bloquean por este alcaloide (Pribilla y col, 1992), tal como se comporta el RGly *in situ*. Además, los hetero-oligómeros α/β presentan conductancias iguales a las que se registran en la médula espinal de la rata, de tal forma que se corrobora la noción de que el RGly es, en forma nativa, un hetero-oligómero α/β .

Los datos referentes a la subunidad α del RGly, enunciados arriba, indican que existen variantes que presentan diferencias puntuales, mismas que explican, aparentemente, la discriminación entre unos y otros agonistas; fundamentalmente, la mayor conductividad de unas variantes respecto a la de otras. Un caso extremo de dicha situación lo constituye una doble mutante de la subunidad α , reportada por Schmieden y sus colaboradores (1993), en la cual se intercambiaron la fenilalanina de la posición 159 por una tirosina, y la tirosina de la posición 161 por una fenilalanina. La variante resultante fue 3 veces más sensible a la β -alanina que a la glicina ($EC_{50} = 7 \mu M$ vs $22 \mu M$), así que, parece ser que los residuos de aminoácidos que participan en el reconocimiento de los agonistas son los que se encuentran en la posición 112 y 212, que son los que impiden que se reconozca a la taurina, y también los que ocupan la posición 159 y 161, que discriminan entre la glicina y la β -alanina; finalmente, el aminoácido en la posición 160, que es una glicina, determina la alta sensibilidad a la estricnina.

El grupo de M Montal, en los Estados Unidos, ha hecho una contribución importante a la dilucidación de la estructura del canal de Cl^- del RGly, al sintetizar diversos péptidos con la secuencia de los supuestos segmentos transmembranales y utilizar a éstos para generar canales aniónicos. Así, han determinado que solamente el M2 forma un canal aniónico, el que presenta tres características sobresalientes: la primera, que los residuos de arginina son determinantes para la conductividad; la segunda, que los canales formados por los péptidos son octámeros, y la tercera, que la estricnina no puede bloquear a este canal, aunque sí lo hacen otras moléculas que inhiben intercambiadores o canales aniónicos, como el ácido niflúmico, la lidocaína y la picrotoxina (Laxma-Reddy y col, 1993). Todo esto

sugiere que la estricnina requiere de ser reconocida por las secuencias extracelulares para poder bloquear al canal aniónico del RGly, y que el canal, en sí mismo, puede no ser tan específico con respecto a los antagonistas que lo inhiben.

D. La subunidad de 93 kDa: gefirina

El aislamiento y la clonación del gen de la proteína de 93 kDa fue logrado en 1992 (Prior y col, 1992). El marco de lectura del gen corresponde a una proteína con 736 residuos de aminoácidos, con un sitio de unión covalente de 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 ha sido renombrada como gefirina, del vocablo griego que significa puente (Prior y col, 1992), por que se sabe que la proteína se une a la tubulina con muy alta afinidad (Kirsch y col, 1991) y quizá así se fija al citoesqueleto y ancla al RGly. Un hecho que corrobora esta noción es que, cuando se impide la traducción del ARNm de la gefirina en las neuronas de la médula espinal en cultivo, éstas no pueden incorporar al RGly a la membrana plasmática, aun cuando los niveles de las otras subunidades no se alteren (Kirsch y col, 1993).

Así, el RGly es el único receptor ionotrópico para el cual se tiene la evidencia de que el citoesqueleto de la post-sinapsis, en este caso por medio de la gefirina, lo mantiene en posición fija: hasta 1993 se conocía de la participación de la agreguina, una proteína de matriz extracelular, en el anclaje del nACR, mientras que para el resto de los receptores de aminoácidos se supone que el anclaje debe mediar por el citoesqueleto, sin tener todavía una evidencia que sustentara tal idea (Froehner, 1993).

El que los ARN mensajeros del gen de la gefirina se encuentren, además de en el sistema nervioso central, en el hígado, el pulmón y el riñón, junto con la evidencia de que se une a la tubulina, sugirió que la gefirina pudiera realizar funciones generales de anclaje de las proteínas membranales con el citoesqueleto, en lugar de tener una función única dentro del complejo del RGly (Prior y col, 1992) y, en tal caso, es importante reconsiderar la evidencia que se ha obtenido respecto a la localización de las sinapsis gli-

nérgicas por inmunocitoquímica con el uso del anticuerpo mA8-7a, que reconoce a la gefirina.

IV. REGULACIÓN DEL RGly

A. Modificaciones químicas no-fosforilantes

Existen diversos procesos que modifican a la actividad de una proteína, sea ésta una enzima, un transportador o un receptor de membrana. Con respecto al RGly, desde las investigaciones pioneras de Young y Snyder (1974a) se supo que los aumentos en pH disminuyen el coeficiente de Hill (nH) para el desplazamiento de estriquina-³H por glicina, mientras que el desvío hacia a la acidez inhibe este desplazamiento.

Sin embargo, la regulación de la unión de estriquina-³H al RGly no fue estudiada con detalle sino hasta 1986, en que Marvizón y colaboradores reportaron un aumento en la unión de estriquina-³H por las sales de sodio de los aniones Br⁻, Cl⁻, I⁻, SCN⁻, NO₃⁻, HCOO⁻, SO₄²⁻, y CH₃COO⁻, lo que se explicó por la interacción de los contraiones sobre el canal del RGly y proporcionando así apoyo a la idea que la estriquina se une este poro (Marvizón y col, 1986). Más tarde, Ruiz-Gómez y colaboradores (1991a) demostraron que la reducción de los puentes disulfuro aumenta el nH en el desplazamiento de estriquina-³H por glicina, pero ocurre lo contrario al estabilizar éstos por oxidación. Así, se originó la idea de que la oxidación-reducción de los grupos sulfhidrido del receptor pueden modular su función *in situ* (Ruiz-Gómez y col, 1991a), idea que se corroboró más adelante, mediante registros electrofisiológicos de las células ganglionares de la retina (Pan y Lipton, 1992).

B. Modificaciones fosforilantes

Se reconoce que la incorporación covalente de grupos fosfato a las proteínas es un mecanismo para regular su actividad (Dohlman y col, 1991), y para el RGly se estudió por primera vez en 1990, cuando Song y Huang registraron, en las neuronas espinales del nervio trigémino de la rata, un aumento en la corriente de Cl⁻ como resul-

tado de la intraperfusión con adenosil monofosfato cíclico (AMPC), o con la proteína cinasa dependiente de éste (PKA). Por el contrario, Agoypan y sus colaboradores (1993) registraron un descenso en la corriente del RGly en las neuronas talámicas del núcleo ventromedial luego de perfundirlas con AMPC, efecto que pudo ser revertido por la aplicación de H8, droga que inhibe a la PKA, señalando con ello que esta cinasa también participa en el fenómeno. Los efectos opuestos pueden deberse a que se estudiaron diferentes tipos neuronales, o a que cada neurona presenta isoformas del RGly con susceptibilidad diferente para la fosforilación.

Con una técnica diferente, en las membranas de la médula espinal de la rata, Ruiz-Gómez y colaboradores (1991b), demostraron la fosforilación de la subunidad α del RGly en el asa intracitoplásmica M₃-M₄, y cuando los fragmentos del péptido fosforilado se separaron por cromatografía en capa fina, los residuos de serina resultaron ser los sitios de incorporación de fosfato. La cinética y la farmacología de este proceso señalan que la proteína-quinasa C (PKC) fue la responsable de la fosforilación (Ruiz-Gómez y col, 1991b). Luego se demostró que la tasa de fosforilación por la PKC es más rápida en presencia de agonistas que en presencia de antagonistas del RGly, un indicio de que el receptor en su forma activa es un blanco preferente de la PKC (Vaello y col, 1992), y en un trabajo posterior esta fosforilación disminuyó la corriente del RGly en ovocitos de *Xenopus*, mientras que, en el mismo sistema, la fosforilación mediada por PKA aumentó la corriente (Vaello y col, 1994); así, la fosforilación del RGly *in vivo* puede ocurrir por diversas vías, siendo esto una posibilidad de que interactúen diversos sistemas de neurotransmisores.

La gefirina es una proteína que también se modifica por fosforilación, pero a diferencia de la participación de la PKC y de la PKA en la fosforilación de la subunidad α (Ruiz-Gómez y col, 1991b, Vaello y col, 1992, 1994; Agoypan y col, 1993), Langosch y sus colaboradores (1992) demostraron que la fosforilación de la gefirina no presenta las características farmacológicas de las proteínas-quinasas activadas por nucleótidos cíclicos, ni de la PKC. Aunque no existe controversia, pues el sustrato de cada fosforilación es diferente, en un caso la subunidad α y en éste la gefirina, sí se sugiere que, *in situ*, la fosforilación del RGly ocurre

sobre sus diversas subunidades e incluye la participación de diferentes sistemas.

C. Papel de la gefirina

Como parte de la regulación del RGly, la Gefirina empieza a ocupar un sitio preponderante: aunque su participación en la unión del ligando y en la apertura del canal no se han demostrado (Langosch y col, 1990), los estudios que demuestran que co-purifica con tubulina y que se une a ella con muy alta afinidad ($K_D = 2.5 \text{ nM}$), explican por qué el receptor purificado pueda unirse a tubulina polimerizada (Kirsch y col, 1991).

Por otra parte, la co-expresión de la gefirina con las diferentes variantes de la subunidad α ha demostrado que la primera modifica la afinidad por el ligando: en la línea celular 293, 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 y col, 1992).

La co-expresión de la gefirina con los oligómeros de la variante α_3 , o con los heterodímeros α_2 - α_3 , produjo el mismo fenómeno de regulación, todo lo cual se explicó por la posible interacción de la gefirina con el citoesqueleto (Takagi y col, 1992).

D. 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 por clometiazol en las respuestas electrofisiológicas, tanto por aplicación iontóforética 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 disminuyen 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 y col, 1990).

Este tipo de resultados también se hallaron en el nervio óptico de la rata, donde se demostró un aumento en la afinidad del RGly por la glicina como resultado de la aplicación de diversos corticosteroides y del clometiazol (Prince y Simmonds, 1992). En este caso, como en trabajos anteriores (Gent y col, 1983; Wu y col, 1990), el efecto fue diferencial sobre el RGly con respecto al GABA_A, de modo que los sinérgicos 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).

CONCLUSIONES

El RGly es uno de los receptores ionotrópicos sobre los cuales se ha estudiado más y, a diferencia de los receptores de otros neurotransmisores, es un receptor del que se han hallado muy pocos tipos de subunidades (considérese, por ejemplo, el gran número de subunidades que se conocen del receptor GABA_A, del nAChR o de los receptores de aminoácidos excitadores, tanto de tipo NMDA como no NMDA). Quizá esto refleje que, en realidad, pese a las diversas variantes de subunidades encontradas en el RGly, este receptor sea más homogéneo que el resto de los integrantes del grupo de los receptores ionotrópicos; pero no debe descartarse la posibilidad de que las variantes del RGly no hayan sido percibidas por circunstancias experimentales: consideremos que, debido al uso exclusivo de la estricnina-3H para señalar al RGly, nadie se percató del otro receptor donde la glicina actúa, el cual es el tipo NMDA de aminoácidos excitadores, hasta que este hecho se hizo evidente por electrofisiología de neuronas en cultivo (Johnson y Ascher, 1987). Hasta ahora sabemos de esos dos sitios de acción de la glicina como neurotransmisor, pero todos los otros neurotransmisores también actúan sobre receptores de tipo metabotrópico, algo que nadie ha sugerido para la glicina. Puede ser que la carencia de evidencia al respecto se deba a un rígido esquema experimental, dentro del cual se encasilla a la glicina como una molécula que activa a un canal de Cl^- intrínseco al RGly.

REFERENCIAS

- Agopyan N, N Tokutomi y N Akaike, *Neuroscience* (1993) **56**: 605-615.
- Akagi H y R Miledi, *Science* (1988) **242**: 270-273.
- Altschuler RA, H Betz, MH Parakkal, KA Reeks y R J Wenthold, *Brain Res* (1986) **369**: 316-320.
- Aprison MH, The discovery of the neurotransmitter role of glycine. En: *Glycine neurotransmission*, Ottersen, OP y J Storm-Mathisen (eds), John Wiley & Sons, New York, (1990) pp 1-24.
- Betz H, *TINS* (1991) **14**: 458-461.
- Borbe H, WE Müller y U Wöllert, *Brain Res* (1981) **205**: 131-139.
- Bormann, J, Patch-clamp studies of glycine-gated chloride channels, En: *Glycine Neurotransmission*, Ottersen, OP y J Storm-Mathisen (eds), John Wiley & Sons, (New York 1990) pp 111-138.
- Bormann J, OP Hamill y B Sakmann, *J Physiol*, (1987) **385**: 243-286.
- Bormann J, N Runsdtröm, H Betz y D Langosch, *EMBO J* (1993) **12**: 3729-3737.
- Curtis DR, AW Duggan y GAR Johnston, *Exp Brain Res* (1971) **12**: 547-565.
- Davidoff, RA, RP Shank, LT Graham, MH Aprison y R Werman, *Nature* (1967) **214**: 680-681.
- Dohlman, HG, J Thorner, MG Caron y RJ Lefkowitz, *Ann Rev Biochem* (1991) **60**: 653-688.
- Froehner SC, *Ann Rev Neurosci* (1993) **16**: 347-368.
- García-Calvo M, A Ruíz-Gómez, J Vázquez, E Morato, F Valdivieso y F Mayor Jr, *Biochem* (1989) **28**: 6405-6409.
- Gent, JP y TA Wacey, *Br J Pharmacol* (1983) **80**: 439-444.
- Graham D, F Pfeiffer y H Betz, *Biochem, Biophys, Res Comm* (1981) **102**: 1330-1335.
- Grenningloh G, A Rienitz, B Schmitt, H Betz, B Methfessel, M Zensen, K Beyreuther y ED Gundelfinger, *Nature* (1987) **328**: 215-220.
- Grenningloh, G, V Schmieden, PR Schofield, PH Seeburg, T Siddique, TK Mohandas, CM Becker y H Betz, *EMBO J*, (1990a) **9**: 771-776.
- Grenningloh G, I Pribilla, P Prior, G Malthaup, K Beyreuther, O Taleb y H Betz, *Neuron* (1990b) **4**: 963-970.
- Harrison NL y MA Simmonds, *Br J Pharmacol*. (1983) **80**: 387-394.
- Johnson, JW y P Ascher, *Nature*, (1987) **325**: 529-531.
- Johnson G, T Drummond, PA Boxer y R Bruns, *J Med Chem*, (1992) **35**: 233-241.
- Kirsch J, D Langosch, P Prior, UZ Littauer, B Schmitt y H Betz, *J Biol Chem* (1991) **266**: 22242-22245.
- Kirsch J, I Wolters, A Triller y H Betz, *Nature* (1993) **366**: 745-747.
- Kuhse J, V Schmieden y H Betz, *Neuron* (1990) **5**: 867-873.
- Langosch D, H Betz y C-M, Becker Molecular structure and developmental regulation of the inhibitory GlyR, En: *Glycine neurotransmission*, Ottersen, OP y J Storm-Mathisen, J (eds) (John Wiley & Sons, New York, 1990) pp 67-82.
- Langosch D, W Hoch y H Betz, *FEBS lett* (1992) **298**: 113-117.
- Langosch, J Kirsch y Betz H, *Neuron* (1992) **8**: 1161-1170.
- Laxma-Reddy G, T Iwamoto, JM Tomich y M Montal, *J Biol Chem* (1993) **268**: 14608-14615.
- Malosio ML, B Marquize-Pouey, J Kuhse y H Betz *EMBO J* (1991) **10**: 2401-2409.
- Marvizón, JC, J Vázquez, M García Calvo, F Mayor Jr, A Ruíz-Gómez, F Valdivieso y J Benavides, *Mol Pharmacol* (1986) **30**: 590-597.
- Müller, WE y SH Snyder, *Brain Res* (1978) **143**: 487-498.
- Pan ZH y ST Lipton, *Soc Neurosci Abs* (1992) **18**: 394.
- Pfeiffer F, y H Betz, *Brain Res* (1981) **226**: 273-279.
- Pfeiffer F, D Graham y H Betz, *J Biol Chem* (1982) **257**: 9389-9393.
- Pfeiffer F, R Simler, G Grenningloh y H Betz, *Proc Natl Acad Sci* (1984) **81**: 7224-7227.
- Pribilla I, T Takagi, D Langosch, J Bormann y H Betz, *EMBO J* (1992) **11**: 4305-4311.
- Prince RJ y MA Simmonds, *Neuropharmacol* (1992) **31**: 201-205.
- Prior P, B Schmit, G Grenningloh, I Pribilla, G Muthaup, K Beyreuther, Y Maulet, P Werner, D Langosch, J Kirsch y H Betz, *Neuron* (1992) **8**: 1161-1170.
- Ruiz-Gómez A, M García-Calvo, J Vázquez, JC Marvizón y F Mayor Jr, *J Neurochem* (1989a) **52**: 1775-1780.
- Ruiz Gómez A, C Fernández-Shaw, F Valdivieso y F Mayor Jr, *Biochem Biophys Res Comm* (1989b) **160**: 374-81.
- Ruiz-Gómez A, E Morato, M García-Calvo, F Valdivieso y F Mayor Jr, *Biochem* (1990) **29**: 7033-7040.
- Ruiz-Gómez A, C Fernández-Shaw, E Morato, JC Marvizón, J Vázquez, F Valdivieso y F Mayor Jr, *J Neurochem* (1991a) **56**: 1690-1697.
- Ruiz-Gómez A, ML Vaello, F Valdivieso y F Mayor Jr, *J Biol Chem* (1991b) **266**: 559-566.
- Sakmann B, OP Hamill y J Bormann, *Plüggers Arch*, (1982) **392**: R19.
- Sakmann B, OP Hamill y J Bormann, *J Neural Transm Suppl* (1983) **18**: 83-95.
- Schaeffer JM y S Anderson, *J Neurochem* (1981) **36**: 1597-1600.
- Schmieden V, G Grenningloh, PR Schofield y H Betz, *EMBO J* (1989) **8**: 695-700.

- Schmieden V, J Kuhse y H Betz, *EMBO J* (1992) 11: 2025-2032.
- Schmieden V, J Kuhse y H Betz, *Science* (1993) 262: 256-258.
- Schofield PR, N Fujita, DR Burt, FA Stephenson, H Rodríguez, LM Rhee, J Ramachandran, V Reale, TA Glencorse, PH Seeburg y EA Barnard, *Nature* (1987) 328: 221-227.
- Schofield, G. Grenningloh, H Kettenmann, H Betz y P H Seeburg, *Neuron*, (1989) 2: 1491-1497.
- Song, Y y L-YM Huang, *Nature* (1990) 348: 242-245.
- Sontheimer H, CM Becker, DB Pritchett, PR Takagi, T, I Pribilla, J Krusch y H Betz, *FEBS Lett* (1992) 303: 178-180.
- Steinbach, JH y C Ifune, *Trends Neurosci* (1989) 12: 3-6.
- Takahashi, T y A Momiyama, *Neuron* (1991) 7: 965-969.
- Taleb O y H Betz, *EMBO J* (1994) 13: 1318-1324.
- Tokutomi M, M Kaneda y N Akaike, *Br J Pharmacol*, (1989) 97: 363-360.
- Triller A, F Pfeiffer, H Betz y H Korn, *J Cell Biol* (1985) 101: 683-688.
- Vaello ML, A Rufz-Gómez y F Mayor Jr, *Biochem Biophys Res Comm* (1992) 188: 813-819.
- Vaello M-L, A Rufz-Gómez, J Lerma y F Mayor Jr, *J Biol Chem* (1994) 269: 2002-2008.
- Vandenberg RJ, CR French, PH Barry, J Shine y PR Schofield, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1992) 89: 1765-1769.
- Werman R, PA Davidoff y MH Aprison, *Nature* (1967) 214: 681-683.
- Werman R y MH Aprison, Glycine: the search for a spinal cord inhibitory transmitter. En: *Structure and functions of inhibitory neuronal mechanisms*, von Euler, CS Skoglund y U Soderberg (eds) (Pergamon Press, Oxford, 1968) pp 473-486.
- Wu, F-S, TT Gibbs y DH Farb, *Mol Pharmacol* (1990) 37: 597-602.
- Young AB y SH Snyder, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1973) 70: 2832-2836.
- Young AB y SH Snyder, *Mol Pharmacol* (1974a) 70: 790-809.
- Young AB y SH Snyder, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, (1974b) 71: 4002-4005.

ABSTRACT

Glycine is the major inhibitory neurotransmitter in the mammalian spinal cord. In this tissue, glycine opens a chloride channel which is antagonized by the alkaloid strychnine. The interaction between glycine and strychnine over the post-synaptic glycine receptor is one of the best examples of agonist and antagonist specificity, as well as of which investigation strategies are being followed in order to clarify the identity of a transmitter together with its receptors characteristics. In this work we describe the most relevant information relative to the way in which the glycine-strychnine relationship is being taken advantage of in order to make out of GlyR one of the best electrophysiological, biochemical and molecular biology receptors known to date.

Pérez-León y Salceda (1997) La neurotransmisión glicinérgica en la retina de los vertebrados.
Boletín de Educación Bioquímica, 16:140-146.

LA NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS

Jorge Alberto Pérez León y Rocío Saiceda Sacanelles. Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, Apartado Postal 70-256, FAX (525) 622 5607.

RESUMEN

En la retina los fotorreceptores transforman la luz en un impulso nervioso que se transmite a las células bipolares y de éstas a las ganglionares, las que lo conducen al encéfalo por el nervio óptico. El impulso se modula dentro de la retina por la actividad de las células horizontales, amacrinas e interplexiformes. La glicina se libera de la retina por estímulos despolarizantes e hiperpolariza a las células horizontales, amacrinas, bipolares y ganglionares. En la retina se ha encontrado el sistema de transporte de alta afinidad de glicina y su receptor postsináptico. Estos resultados demuestran que la glicina funciona como neurotransmisor en las capas plexiformes de la retina, donde modulan la actividad de las interneuronas y del impulso nervioso generado en los distintos tipos de fotorreceptores.

PALABRAS CLAVE: Visión, sinapsis, aminoácidos, receptores, interneuronas.

ABSTRACT

In the retina the photoreceptors transform the light into a nerve impulse which is transmitted to the bipolar cells, through them to the ganglion cells and by their axons into the encephalon. The horizontal, amacrine and interplexiform cells modulate the primary impulse before it arrives into the encephalon. In the retina the release of glycine by depolarization has been shown as well as the presence of the high affinity glycine uptake system and the postsynaptic glycine receptor on several interneurons. This shows that glycine serves as a neurotransmitter in retinal plexiform layers, modulating the activity of the interneurons and also the nerve impulse from the distinct photoreceptors.

KEY WORDS: Vision, synapse, amino acids, receptor, interneurons.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso permite que los organismos extraigan información de las características del ambiente y se adapten a él con éxito. Para lograr esto, el sistema nervioso se sirve de los órganos de los sentidos, que captan diversas formas de estímulos que el organismo procesa y a los cuales responde. En el caso de los estímulos visuales, la retina sustrae información de la energía luminosa y la transforma en impulsos eléctricos, que es la forma en que llega al sistema nervioso.

La retina logra esta función porque dentro de ella existen neuronas especializadas: los fotorreceptores, de los que hay dos tipos, los conos y los bastones, que reciben y transforman los estímulos luminosos. Los conos son sensibles a la luz de diferentes longitudes de onda, es decir, de diferentes colores, mientras que los bastones sólo son sensibles a luz de baja intensidad o escotópica. El impulso nervioso generado en los fotorreceptores se transmite a las células bipolares y, antes de transmitirse al encéfalo, las interneuronas retinianas realizan una integración primaria del impulso nervioso. La estructura histológica de la retina, de la que se muestra un esquema en la figura 1, es un reflejo de cómo ocurre este flujo de información.

Los fotorreceptores establecen sinapsis con las dendritas de las células bipolares y horizontales en la capa plexiforme externa. Las células bipolares extienden su axón dentro de la capa plexiforme interna, en donde hacen contacto sináptico con las dendritas de las células ganglionares. Los axones de las células ganglionares, por su parte, se fusionan y mielinizan y forman el nervio óptico, mediante el cual el impulso nervioso llega al encéfalo. La ruta que sigue el impulso a través de los fotorreceptores a las células bipolares y las células ganglionares, se conoce como la vía vertical de la retina (1).

Los somas de las células horizontales, las amacrinas e interplexiformes están en la capa nuclear interna y median la llamada vía horizontal de la retina. Las células horizontales tienen sus procesos, tanto dendritas como axones, en la capa plexiforme externa, lo que les permite recibir el impulso de un fotorreceptor y

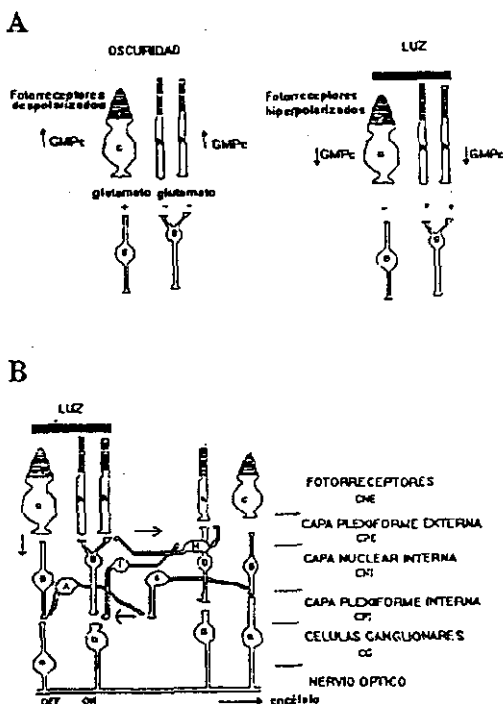


Figura 1. Esquema de la fototransducción (A) y de la organización histológica (B) de la retina de los vertebrados. En la oscuridad los fotorreceptores están despolarizados, contienen concentraciones altas de GMPc y liberan continuamente glutamato, que actúa sobre las células bipolares, excitándolas (+) o inhibiéndolas (-). En respuesta a la luz, los fotorreceptores se hiperpolarizan y disminuye su concentración de GMPc, dejando de liberar glutamato, con lo que las células bipolares se desinhiben (+) o dejan de excitarse (-). En B se presenta la distribución de las capas celulares y sinápticas de la retina: los somas de los fotorreceptores, conos (C) o bastones (R), forman la capa nuclear externa (CNE), las células bipolares (B), horizontales (H), amacrinas (A) e interplexiformes (I) forman la capa nuclear interna (CNI) y las células ganglionares, la capa plexiforme externa (CPE) y la capa plexiforme interna (CPI). Las flechas señalan el flujo de información en dirección vertical por los fotorreceptores-bipolares-ganglionares, y en dirección horizontal, dentro de las capas plexiformes, por medio de las interneuronas. Los circuitos se activan (ON) o se inactivan (OFF) por la estimulación luminosa.

transmitirlo a otro fotorreceptor adyacente o a una célula horizontal. Las amacrinas y las interplexiformes son el elemento postsináptico de las células bipolares, las prolongaciones de las amacrinas se extienden dentro de la capa plexiforme interna y establecen contacto sináptico con otras células amacrinas, con bipolares e incluso con células ganglionares. En cambio, las interplexiformes tienen prolongaciones dentro de la capa plexiforme externa e interna y son un elemento de comunicación entre éstas.

En la oscuridad los fotorreceptores mantienen un estado despolarizado de su potencial eléctrico, equivalente a una etapa de excitación, por lo que liberan constantemente un transmisor químico, que es el glutamato y que actúa sobre las células bipolares. La luz, al incidir sobre la proteína rodopsina, en los segmentos externos de los fotorreceptores, desencadena una cascada enzimática que termina en el descenso de la concentración del mensajero intracelular monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Esta molécula mantiene abierto un canal que permite la entrada de cationes, al descender la concentración de GMPc este canal se cierra y ocasiona que el fotorreceptor se hiperpolarice, es decir que se inhiba, y se suspenda la liberación de glutamato (1).

El glutamato tiene acciones opuestas sobre dos distintos tipos de células bipolares: inhibe a algunas de éstas, mientras que excita a otras; en consecuencia, bajo la estimulación luminosa el primer tipo de célula bipolar se excita y se conoce como célula bipolar ON, el segundo tipo de célula bipolar deja de recibir el mensaje excitatorio durante la estimulación luminosa, por lo que se inhibe y se conoce entonces como célula bipolar OFF. Las células bipolares mantienen el signo de la sinapsis primaria: si se excitaron por la estimulación luminosa, excitan, a su vez, a la célula ganglionar con la que hacen sinapsis, de forma que las bipolares ON conectan con células ganglionares ON y las bipolares OFF con células ganglionares OFF.

El área de fotorreceptores que al ser excitados producen una respuesta en una neurona determinada, se conoce como el campo receptivo de ésta. Un estímulo luminoso suficientemente pequeño que estimule sólo a una célula fotorreceptora activará únicamente a una célula bipolar, si el estímulo abarca a otra célula fotorreceptora, la respuesta de la célula

bipolar y de la ganglionar, dentro de la vía vertical del primer fotorreceptor, se reducirá hasta desaparecer, mientras que la respuesta de las células de la vía vertical del segundo fotorreceptor empezará a aumentar. Como la activación de un circuito coincide con la inhibición del adyacente, se dice que los circuitos retinianos son antagónicos, por lo general se encuentra un circuito ON adyacente a un circuito OFF. Esto significa que un estímulo luminoso dentro del campo receptivo de una neurona activa alguna vía de inhibición sobre los circuitos adyacentes y, efectivamente, las vías horizontales en la retina, representan vías de inhibición y los neurotransmisores que liberan las células horizontales, amacrinas e interplexiformes son de tipo inhibitorio. Entre los neurotransmisores de tipo inhibitorio se encuentra la glicina, que funciona como posible neurotransmisor de la retina de varias especies de vertebrados.

La organización de la retina en circuitos antagónicos se conserva en las estructuras centrales de la visión, que son el núcleo geniculado lateral del tálamo y la corteza occipital en los mamíferos, es decir que la retina es primer paso de un sistema jerárquico de información que se rige bajo el mismo principio.

SISTEMA DE LIBERACIÓN Y DE TRANSPORTE DE LA GLICINA

Varias evidencias experimentales apoyan la idea de que la glicina funciona como neurotransmisor en la retina. En respuesta a un estímulo una neurona libera un neurotransmisor, se ha demostrado que esta liberación es dependiente de Ca^{++} , ya que este catión permite que las vesículas que contienen al neurotransmisor se fusionen a la membrana presináptica y liberen su contenido al espacio sináptico. Por tanto, la liberación de la glicina de las neuronas retinianas en respuesta a un estímulo, señalaría inequívocamente que ésta se utiliza como neurotransmisor. Al respecto hay datos que indican que, en las retinas del pez, la rana y el conejo, la despolarización con concentraciones altas de K^+ provoca la liberación de glicina- H^3 previamente acumulada y de que el mismo efecto se produce en los sinaptosomas aislados de la retina del pollo (2) y de la rana (3). La estimulación luminosa provoca que se libere la glicina de la retina del gato y de la rata (2). En la rana se detectó que la liberación de glicina se realiza por las células amacrinas (3).

Una de las ideas básicas en la biología sináptica es que debe existir un mecanismo que termine con la actividad del neurotransmisor, ya sea por la degradación de la molécula o por su eliminación del espacio sináptico, mediante un sistema de transporte que acumule al transmisor dentro de la terminal presináptica. De acuerdo a este principio, la caracterización y localización del sistema de transporte de glicina, se ha utilizado para definir a las vías glicinérgicas (2 y 3). Para la glicina se ha descrito un sistema de transporte con afinidad en el intervalo de concentraciones micromolares, que realiza la acumulación de glicina de manera dependiente de Na^+ y de energía metabólica.

El sistema de transporte de alta afinidad para la glicina se ha descrito en la retina del pez dorado, la rana y el conejo, así como en las terminales sinápticas aisladas de la retina de la rana (3). La identificación de las células que acumulan a la glicina se ha logrado mediante la técnica de autorradiografía, con la que se observa la acumulación de la glicina- H^3 en las células amacrinas e interplexiformes. En los peces y anfibios las neuronas que acumulan glicina presentan contactos sinápticos con otras amacrinas. Además de las células amacrinas e interplexiformes hay algunas células bipolares que también acumulan glicina- H^3 (2).

En la retina de la tortuga y del pollo el transporte de glicina se lleva a cabo por células amacrinas de diversos tipos, en el pollo algunas contienen además péptidos neuroactivos, y es probable que manejen, junto con la glicina, a estas otras moléculas como neurotransmisores.

La caracterización autorradiográfica de las neuronas que acumulan glicina- H^3 se ha llevado a cabo en un gran número de especies dentro de la clase de los mamíferos. Así se observó que en las retinas del mono y del humano el 53% de las células amacrinas acumulan glicina, entre ellas un subtipo conocido como A7, que presenta uniones comunicantes con otras células amacrinas. Un resultado constante con esta técnica es el marcaje de las células amacrinas denominadas A11, que son el relevo sináptico de las bipolares de bastones y que mantienen conexiones con las células bipolares de los conos.

En contraste con el resto de los vertebrados, en los mamíferos las neuronas que acumulan glicina, ad-

más de las células amacrinas, son las bipolares que hacen sinapsis con los conos, lo que sugiere que en la visión cromática existe un circuito glicinérgico en los mamíferos (2).

Con la técnica del manejo de los ácidos nucleicos, se ha aislado y clonado el gen para el transportador de glicina, denominado GlyT1, que es una proteína integral de 633 aminoácidos que forman 12 segmentos transmembranales. El GlyT1 es homólogo a los transportadores del ácido γ -amino-butírico (GABA) y de dopamina, con los que constituye una familia de transportadores de neurotransmisores. Mediante la técnica inmunohistoquímica se ha detectado la presencia de GlyT1 en los somas de las células amacrinas de la retina de la rata (4).

EL RECEPTOR POSTSINÁPTICO DE LA GLICINA (RGly)

Los transmisores actúan sobre dos grandes tipos de receptores: los receptores metabotrópicos, que son receptores acoplados a la síntesis de mensajeros intracelulares (segundos mensajeros, como el diacilglicerol o el inositol trifosfato), o sobre los receptores ionotrópicos. La acción del neurotransmisor sobre un receptor ionotrópico consiste en provocar un cambio en la polaridad de la membrana. Esto se logra porque el neurotransmisor abre vías de permeabilidad por las que pasan los iones de un lado de la membrana hacia el otro. Las vías de permeabilidad son complejos proteicos, conocidos como canales iónicos, y los iones que participan son principalmente el Na^+ , Cl^- , K^+ o Ca^{++} , por mencionar algunos. Cada uno de los canales iónicos es selectivo para un ión y cada neurotransmisor activa solamente a un tipo de canal, de forma que se puede asociar la actividad de un transmisor específico con la apertura de un canal iónico determinado. Un neurotransmisor que abra un canal de cationes llevará el potencial de membrana de la neurona a un estado más positivo o despolarizado, en cuyo caso se habla de un neurotransmisor excitatorio. Un neurotransmisor inhibitorio abre un canal de aniones, y lleva el potencial de membrana a un estado más negativo o hiperpolarizado. En el caso del receptor postsináptico de la glicina (RGly), el canal es selectivo a Cl^- y el complejo se compone por tres subunidades diferentes: α , β y gefirina, con masas moleculares de 48, 58 y 93 kDa. Las subunidades α y β son proteínas transmembranales que se presentan en proporción

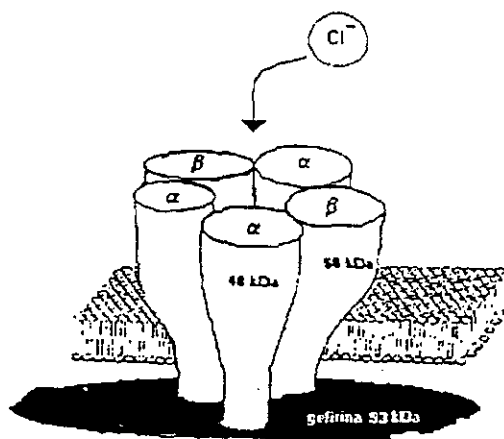


Figura 2. Composición oligomérica del receptor de glicina. Dentro de la subunidad está el sitio de reconocimiento de la glicina y de la estricnina (antagonista) y las subunidades α y β forman al canal por donde fluyen los iones Cl^- una vez que el receptor se activa por la glicina.

de 3:2 y forman, al mismo tiempo, el sitio de unión de la glicina y el canal por el que se conduce la corriente de Cl^- . La gefirina es una proteína periférica de membrana que une a todo el complejo con el citoesqueleto neuronal. En la figura 2 se muestra un esquema de la composición oligomérica del RGly. A la fecha se conoce la secuencia de aminoácidos y los genes de las tres subunidades.

Existen varias estrategias para detectar la presencia de un receptor dentro de cierto tejido, una de ellas es con el uso de ligandos del receptor que se marquen con radioactividad, la otra es la detección directa de la proteína con el uso de anticuerpos que la reconozcan, o del ARN mensajero de esa proteína. En el caso del RGly en la retina, se ha utilizado a la estricnina- H^3 , el inhibidor más potente y específico del RGly como ligando radioactivo y se cuenta con anticuerpos que reconocen a las subunidades α , β y a la gefirina, también se ha podido señalar la presencia de los ARN mensajeros.

Los estudios de unión de la estricnina- H^3 se han realizado en membranas totales de la retina de la rata y del bovino (2), en las que la cinética y la farmacología son semejantes a las obtenidas de la médula espinal de la rata. En membranas sinaptosomales de la retina de la rana, la estricnina- H^3 tiene sitios de unión insensibles a diversos ligandos que reconocen al

RGly de la médula espinal, y la glicina- H^3 tiene sitios de unión en los que no actúa la estricnina, pero que no pueden atribuirse a un receptor diferente del RGly (5), lo que sugiere que, en la retina de los anfibios se presentan isoformas atípicas del RGly.

Existen varios anticuerpos monoclonales que reconocen a las subunidades del RGly, entre ellos está uno que reacciona con la gefirina y otro que reconoce a todas las isoformas de las subunidades α y β .

En los peces, los anfibios, los reptiles y las aves, el anticuerpo que reconoce a la gefirina marca a los somas de las amacrinas y de las ganglionares que son postsinápticos a las células interplexiformes (6 a 8), este patrón indica que el RGly puede mediar una inhibición lateral entre circuitos vecinos.

En la rana *Xenopus laevis* la gefirina se encontró distribuida de manera dispersa sobre la capa plexiforme externa, en membranas de células postsinápticas a células interplexiformes y subsinápticas a varios fotorreceptores, de nuevo se sugiere que el RGly participa en la transmisión lateral dentro de ambas capas plexiformes de los anfibios.

La distribución del RGly se ha estudiado en un mayor número de especies de mamíferos. En el gato la gefirina se ha encontrado distribuida de manera uniforme en toda la capa plexiforme interna y sobre las células ganglionares, el resto de las subunidades se restringen a dos bandas estrechas en la capa plexiforme interna, una en la parte central y otra cerca de la capa nuclear interna y en algunas células ganglionares y amacrinas (9). Los estudios con microscopía electrónica revelaron que las neuronas que presentan inmunoreactividad a la gefirina son postsinápticas para algún tipo de amacrina, lo que demuestra que la interneurona glicinérgica, dentro de la retina interna de los mamíferos, es una amacrina. La misma distribución se encontró en el conejo, el mono y la rata. En todas estas especies se detectaron las subunidades α_2 , α_3 y β dentro de la capa plexiforme externa, elemento que puede considerarse como un indicio de la participación glicinérgica en la retina externa de los mamíferos.

La detección de los ARN mensajeros de las subunidades del RGly en la retina, se ha estudiado

sólo en la rata (10) y se distribuyen de la siguiente forma: el de la subunidad α_1 está en los somas de la capa nuclear interna y de algunas células ganglionares, el de la subunidad α_2 en los somas de células amacrinas y de la mayoría de las ganglionares, y los correspondientes a las subunidades α_3 , β y gefirina están dispersos sobre la mayoría de los somas de la capa nuclear interna y de las células ganglionares. En preparaciones de células aisladas se demostró que las bipolares de bastones expresan únicamente a la subunidad α_1 .

El análisis del efecto de la glicina sobre las neuronas retinianas *in vitro* puede establecer con precisión cuál es el papel de este aminoácido dentro de los circuitos retinianos. La aplicación de la glicina hiperpolariza a las células horizontales de los peces, con lo que disminuyen su respuesta a la luz, en especial a la luz roja (3), de lo que se deduce que, en estas neuronas existe un circuito glicinérgico en la percepción del color a nivel de la capa plexiforme externa, probablemente por medio de una célula interplexiforme. En el pez dorado se han registrado también corrientes de Cl^- mediadas por el RGly en las células ganglionares (2).

En la retina de los anfibios la glicina afecta el potencial de membrana de las células amacrinas, bipolares y ganglionares, sobre estas últimas ejerce una inhibición tónica que ayuda a establecer la organización de los campos receptivos. Además, la glicina activa a una vía polisináptica que termina con la hiperpolarización de las células horizontales. Este efecto indirecto de la glicina sobre las células horizontales puede ocurrir por la acción de una célula interplexiforme glicinérgica que despolariza a una interneurona GABAérgica (inhibitoria), y esta última sea la que inhiba a la célula horizontal. En apoyo a esta idea, se ha reportado la liberación de GABA- H^3 de la retina de *Xenopus laevis* por efecto de la glicina. Esta acción excitatoria de la glicina puede ocurrir debido a que el potencial de equilibrio del Cl^- en algunas neuronas retinianas, es más despolarizado que el potencial de la membrana (11). Los datos sugieren la participación de la glicina dentro de los microcircuitos retinianos de ambas capas plexiformes en los anfibios y los peces. De manera semejante, la glicina provoca la hiperpolarización de las células amacrinas de la retina del pollo, que liberan GABA y encefalinas, ambos neurotransmi-

sores inhibitorios. Como consecuencia de la acción de la glicina, la liberación de estos neurotransmisores se suspende, de forma que la glicina modula también la transmisión inhibitoria que realizan otras moléculas.

En la retina de los mamíferos la glicina afecta el potencial de membrana de las células amacrinas, las ganglionares y de algunas bipolares, y su acción está asociada también a la generación de los campos antagónicos. Las células amacrinas y las bipolares de la rata responden a la glicina con una corriente de Cl⁻ que se restringe al soma, así que la glicina pudiera modificar la entrada sináptica a estas células, más que modular su efecto sobre las células ganglionares (13).

En otros mamíferos, como el gato, se presenta una inhibición tónica de las células ganglionares-ON por parte de la glicina, así como la modulación de la vía de los bastones, que actúan sobre sus relevos sinápticos, ya sean células amacrinas o bipolares (2). La glicina inhibe además las respuestas de las células ganglionares-OFF de la retina del conejo, bajo condiciones de adaptación a la luz, mientras que en condiciones de adaptación a la oscuridad, la glicina inhibe las respuestas de las ganglionares-ON, en donde interactúa con un neurotransmisor, probablemente dopamina, que eleva la concentración de AMP cíclico dentro de las ganglionares (14). Así, la glicina puede determinar la generación de los campos receptivos por medio de la interacción con varios sistemas de neurotransmisores. En la retina del conejo se ha reportado también la acción de la glicina sobre las células amacrinas colinérgicas, que participan en la respuesta a la direccionalidad del estímulo luminoso.

CONCLUSIONES

El estudio de la comunicación sináptica intrarretiniana ha demostrado que la glicina es neurotransmisor en, al menos, un tipo de célula amacrina en las diferentes clases de vertebrados que se han estudiado. Así, la glicina realiza la función de establecer contacto entre los circuitos antagónicos vecinos en la retina. Entre los casos mejor entendidos está el que ocurre con la célula amacrina conocida como AII, de la retina de los mamíferos: esta célula recibe la entrada sináptica de las bipolares de bastones y mantiene contacto sináptico con las células ganglionares OFF y

conexiones con las bipolares de conos, de forma que interactúa, al mismo tiempo, con el sistema de visión escotópica (bastones) y con el sistema de visión cromática (conos). La AII es una de las neuronas que acumulan glicina, así que, por su conectividad, la AII puede inhibir glicinérgicamente a las células ganglionares OFF a la vez que activa, mediante propagación electrotonica, a las células bipolares del sistema ON, así se forma un circuito antagónico entre visión cromática y escotópica, con la participación de un solo neurotransmisor: la glicina. Esta idea se muestra en la figura 3.

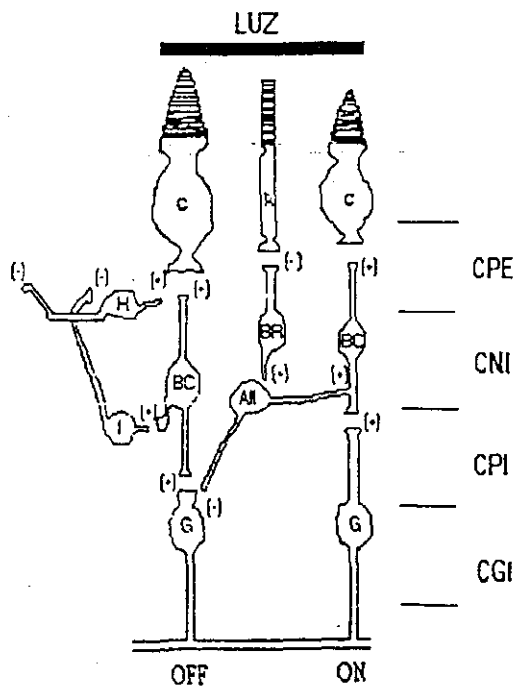


Figura 3. La participación de las neuronas glicinérgicas en el establecimiento de los circuitos antagónicos dentro de la retina. Los signos (+) indican una sinapsis excitatoria y los signos (-) una sinapsis inhibitoria. Las bipolares de bastones (BR) conectan directamente sobre las amacrinas AII y éstas transmiten el impulso electrotonicamente a bipolares de conos (BC), activando a un circuito ON. Al mismo tiempo las AII inhiben, por medio de la glicina, a las ganglionares de un circuito OFF adyacente. Las bipolares de conos estimulan a las interplexiformes glicinérgicas dentro de la capa plexiforme interna y éstas retroalimentan, por medio de la glicina, a las horizontales y a las bipolares dentro de la capa plexiforme externa. La respuesta inhibitoria o excitatoria depende del potencial electroquímico del Cl⁻.

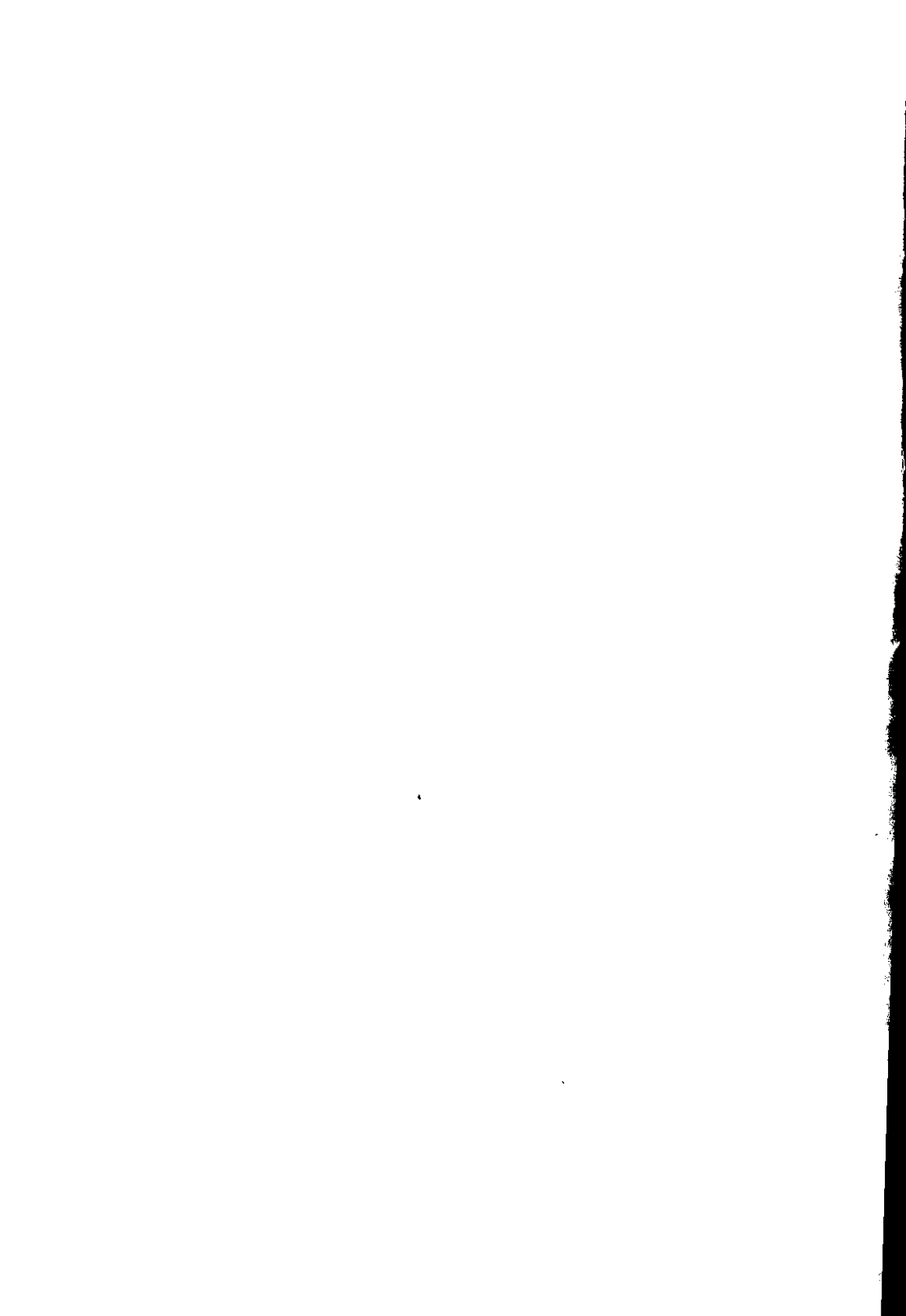
La participación de la glicina en el antagonismo visión cromática/escotópica se sugiere también con base en el hallazgo de ciertas bipolares que transportan glicina y que son el relevo primario de los conos en la retina de los mamíferos, y por las respuestas provocadas por la glicina en las células horizontales sensibles a la luz roja en los peces. La glicina actúa también sobre las neuronas sensibles a la direccionalidad del estímulo visual, con lo que la participación de este aminoácido en la vía horizontal de la retina interna de los vertebrados, incluye diversas propiedades del estímulo visual.

En la capa plexiforme externa de la retina de los peces y los anfibios, la glicina parece modular la respuesta a la luz de las células horizontales, a través de las sinapsis con las células interplexiformes. Es posible que dicha función de la glicina ocurra también en los mamíferos, en vista de la localización de las subunidades y de los ARN mensajeros del RGLy en la capa plexiforme externa de la retina de la rata.

Los datos que se presentan sugieren que, en la retina, el sistema glicinérgico tiene una función compleja: es probablemente el neurotransmisor de las células amacrinas e interplexiformes lo que permite establecer un circuito entre las dos capas plexiformes, el cual participa en la formación de los campos antagonicos.

REFERENCIAS

1. Kandel E, Schwartz J M y Jessel T M (1991) Principles of Neural Science, Appleton Lange, New York, USA, pp 400-417.
2. Pourcho R G y Goebel D J (1990) Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine-containing neurons in the retina. En: Glycine Neurotransmission, Editores Ottersen, O y Storm-Mathisen, J. John Wiley & Sons, pp 355-390.
3. Salceda R (1989) Uptake and K^+ stimulated release of ^{14}C Glycine from frog retinal synaptosomal fractions, *Neurochem Int* 14: 49-54.
4. Zafra F, Aragón C, Olivares L, Danbolt N C y Storm-Mathisen J (1995) Glycine transporters are differentially expressed among central nervous system cells, *J Neurosci* 15: 3952-3969.
5. Pérez-León J A y Salceda R (1995) Different specific binding sites of (^3H) Glycine and (^3H) Strychnine in synaptosomal membranes isolated from frog retina, *Neurochem Res* 8: 915-922.
6. Yazulla S y Studholme K M (1991) Glycinergic IP cells make synaptic contact with AC in goldfish retina, *J Comp Neurol* 310: 1-10.
7. Zucker Ch L y Ehinger B (1993) Synaptic connections involving immunoreactive glycine receptor in turtle retina, *Visual Neurosci* 10: 907-914.
8. Hering H y S Kröger (1996) Formation of synaptic specializations in the inner plexiform layer of the developing chick retina, *J Comp Neurol* 375: 393-405.
9. Grünert U y Wässle H (1993) Immunocytochemical localization of glycine receptors in the mammalian retina, *J Comp Neurol* 335: 523-537.
10. Greferath U, Brandstätter J H, Wässle H, Kirsch H, Kuhse J y Grünert U (1994) Differential expression of glycine receptor subunits in the retina of the rat: a study using immunohistochemistry and *in situ* hybridization, *Visual Neurosci* 11: 721-729.
11. Zhou Z J, Fain G L y Dowling J E (1993) The excitatory and inhibitory aminoacids receptors on HC isolated from the white perch retina, *J Neurophysiol* 70: 819.
12. Huba R y Hofmann H D (1991) Transmitter-gated currents of GABAergic AC-like cells in chick retinal cultures, *Visual Neurosci* 6: 303-314.
13. Boos R, Schneider H y Wässle H (1993) Voltage- and transmitter-gated currents of AII AC cell in a slice preparation of the rat retina, *J Neurosci* 13: 2874-2888.
14. Jensen R J (1991) Involvement of glycinergic neurons in the diminished surround activity of ganglion cells in the dark-adapted rabbit retina, *Visual Neurosci* 6: 43-53.



Antecedentes

En la retina de los mamíferos la transmisión glicinérgica se restringe a la capa plexiforme interna (Wässle y Boycott, 1991), mientras que existen evidencias experimentales, con el uso de técnicas diversas (Voaden, 1976; Borges y Wilson, 1991; Yang y Wu, 1989; Smiley y Yazulla, 1990), de que la glicina actúa como neurotransmisor dentro de ambas capas plexiformes en la retina de la rana, lo que podría ayudar a explicar la complejidad característica de esta retina.

Como parte de la caracterización de la glicina como neurotransmisor en la retina de la rana, Salceda (1989) demostró que la retina completa y sus fracciones sinaptosomales, derivadas de la capa plexiforme externa (P1) y de la capa plexiforme interna (P2) tienen un sistema de transporte para glicina, el cual depende del gradiente electroquímico del ión Na^+ , de energía metabólica y tiene constantes cinéticas de muy alta afinidad (P1 100 μM , P2 46 μM), junto con estas características, se encontró también que diferentes poblaciones celulares liberan glicina en respuesta a los estímulos despolarizantes, lo que concuerda con la propuesta función de la glicina como neurotransmisor.

Posteriormente, se evaluó la presencia de receptores de glicina en la retina de la rana mediante la técnica de unión de alta afinidad de los ligandos radioactivos estriquina- ^3H y glicina- ^3H (Pérez-León y Salceda, 1995).

En el trabajo referido se aislaron las membranas de las fracciones sinaptosomales P1, enriquecida en terminales de fotorreceptores, y P2, que contiene terminales sinápticas provenientes de la capa plexiforme externa; en ellas se comparó la unión específica de glicina- ^3H y estriquina- ^3H . La unión de ambos ligandos radioactivos fue saturable e independiente de la presencia del ión Na^+ , señalando la interacción con receptores de membrana. La unión de glicina- ^3H tuvo una cinética de un sólo sitio en las membranas de las fracciones de P1 y P2, con constantes de afinidad (K_D) de 12 y 82 nM, y constantes de unión máxima (B_{MAX}) de 3.1 y 3.06 picomolas/mg de proteína. En cambio, la unión de estriquina- ^3H presentó una cinética de 2 sitios en cada fracción sinaptosomal, para P1 las K_D 's fueron de 3.9 y 18.7 nM, con B_{MAX} de 1.1 y 7.1 pmolas/mg de proteína. Las membranas de P2 tuvieron K_D 's de 0.6 y 48 nM y B_{MAX} 's de 0.4 y 4.5 pmolas/mg. La unión de glicina- ^3H se inhibió por los aminoácidos β -alanina, L- y D-serina (agonistas de la glicina en el receptor postsináptico de glicina, RGly) y la amino-hidroxi-pirrolidin-2-ona (HA966, agonista parcial del sitio de glicina en el receptor tipo N-metil-D-aspartato, NMDA_R), pero no por la estriquina (antagonista del RGly), ni por los ácidos 7-clorokínurénico y

5,7-diclorokinurénico (inhibidores del sitio de unión de glicina en el NMDA_R). En cambio, la unión de estriquina-³H se inhibió sólo parcialmente por la glicina y los aminoácidos análogos a ella, y se desplazó totalmente con el uso de la molécula 2-amino-estriquina, que es un derivado de la estriquina. A partir de este trabajo se concluyó que, además de unirse al RGly, cada ligando tiene otro sitio de unión que no puede atribuirse al RGly típico o al sitio de glicina dentro del NMDA_R. De esta manera, surgió la necesidad de delimitar más claramente la identidad de los receptores de glicina dentro de la retina de la rana . Se anexa una copia de este trabajo.

Anexo: Pérez-León, JA, Salceda S (1995) Different specific binding sites of ³H-Glycine and ³H-Strychnine in synaptosomal membranes isolated from frog retina. Neurochemical Research, 20:915-922.

Different Specific Binding Sites of [³H]Glycine and [³H]Strychnine in Synaptosomal Membranes Isolated from Frog Retina

Jorge Alberto Pérez-León¹ and Rocío Salceda^{1,2}

(Accepted May 1, 1995)

Synaptosomal fractions were isolated from frog retina: a fraction enriched in photoreceptor terminals (P1) and a second one (P2) containing interneurons terminals. We compared the binding of [³H]glycine and [³H]strychnine to membranes of these synaptosomes. The binding of both radioactive ligands was saturable and Na⁺-independent. [³H]Glycine bound to a single site in P1 and P2 synaptosomal fractions, with K_D = 12 and 82 nM and B_{max} = 3.1 and 3.06 pmol/mg protein respectively. [³H]Strychnine bound to two sites in each one of the synaptosomal fractions. For P1 K_D values were 3.9 and 18.7 nM, and B_{max} values were 1.1 and 7.1 pmol/mg protein, respectively. Membranes from the P2 synaptosomal fraction showed K_D's of 0.6 and 48 nM and B_{max}'s of 0.4 and 4.5 pmol/mg. Specific [³H]glycine binding was displaced by β-alanine, L-serine, D-serine and HA966, but not by strychnine, 7-chlorokynurenic or 5,7-dichloro-kynurenic acids. Specific [³H]strychnine binding was partially displaced by glycine and related aminoacids and totally displaced only by 2-NH₂-strychnine. Our results indicate the presence of high affinity binding sites for glycine and strychnine in frog retinal synaptosomal membranes. The pharmacological binding pattern indicates the presence of the strychnine sensitive glycine receptor as well as other sites. These might not include the NMDA receptor-associated glycine site.

KEY WORDS: Binding; glycine receptor; strychnine; retina; frog.

INTRODUCTION

Electrophysiological, neurochemical and immunocytochemical studies support the role of glycine as neurotransmitter in the vertebrate retina. By autoradiography, glycine has been found to be concentrated in the inner plexiform layer of mammals and in both the outer and the inner plexiform layers of ectotherms (1,2). The glycine receptor (GlyR) has been localized to the retina using immunohistochemistry (3-6) and [³H]strychnine

binding to whole retinal membranes has been demonstrated (7,8). Moreover, electrophysiological responses mediated by the strychnine sensitive GlyR of glycine-evoked responses has been published (1).

Studies in isolated retinas have shown that glycine has several effects on postsynaptic membrane-potentials, acting on different neuronal types (9-12). This suggests a diversity of glycine sites of action throughout the retina.

Glycine acts as a neurotransmitter through the postsynaptic GlyR gating a chloride current antagonized specifically and reversibly by strychnine (7). Besides, it has been shown that glycine modulates the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of acidic aminoacid receptor (NMDA_R) acting at the strychnine-insensitive site (13).

¹Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253 04510, México D.F., México.

²To whom to address reprint requests: Telephone (725) 622 5617, Fax (725) 622 5607

[³H]strychnine binding to membranes of different synaptosomal populations of frog retina and compared it with the [³H]glycine binding.

The kinetic analysis of data from the displacement curves was performed by computational methods using Inplot.4 (version 4.03, Graph Pad Software). The differences detected in the displacement achieved by the different molecules were then analysed for statistical significance by means of the Student's *t* test. Protein was determined by the method of Lowry and co-workers.⁽¹²⁾

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Materials. [³H]Glycine (43, 53 Ci/mmol) and [³H]strychnine (13 Ci/mmol) were purchased from New England Nuclear (Boston, MA). 7-Chloro-kynurenic acid (7CK) and its derivative 5,7 dichloro-kynurenic acid (5,7DCK), 3-amino-1-hydroxypyrrolidin-2-one (HA966), cis-amino-crotonic acid (CACA) and trans-amino-crotonic-acid (TACA) were from Toctris-Neuramin (Bristol, England). The strychnine derivative 2NH₂-strychnine (2-N-stry) and the steroid RU 5135 were a kind gift from Dr. Federico Mayor Jr. from the Autonomous University of Madrid. Other reagents and drugs were from common commercial sources.

Animals. Dark adapted-frogs were decapitated, eyes enucleated and hemisected and the retinas excised under dim red light and placed in Krebs-bicarbonate medium containing, in mM: NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 25, glucose 5.6, pH 7.4.

Preparation of Synaptosomes. To obtain synaptosomal fractions retinas were homogenized (10% w/v) in 0.28 M sucrose and 100 μM MgSO₄ and centrifuged at 500 g for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 1,000 g to obtain a fraction enriched in photoreceptor terminals (P1). The resultant supernatant was centrifuged at 11,000 g for 20 min. The pellet (P2 fraction), contains numerous conventional synaptosomes, most probably derived from the inner plexiform layer. The biochemical and ultrastructural characterization of these fractions has been reported.⁽¹³⁾

Preparation of Synaptosomal Membranes. Membranes were isolated by homogenization of synaptosomes in 20 volumes (w/v) of distilled water and posterior centrifugation at 71,000 g for 20 min. In order to eliminate endogenous ligands, that may obscure specific [³H]glycine binding,⁽¹⁴⁾ the procedure was repeated four times and at this point the membranes were incubated for 30 min at 37 °C in 50 volumes of Ringer containing (in mM): KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.17, glucose 5.6, Tris-HCl 50 at pH 7.4 (Ringer Tris-HCl). The incubation was stopped by centrifugation at 71,000 g for 20 min. The pellet was washed once more in water and finally frozen at -20 °C until the binding was assayed.

Binding Assay. The binding assay was basically performed as described by Young and Snyder.^(15,16) Membranes were thawed, resuspended and incubated in Ringer Tris-HCl at 50–100 μg protein/ml, in the presence of 2 nM of [³H]glycine or [³H]strychnine for 10 min at room temperature. The incubation was stopped by centrifugation at 71,000 g for 20 min. The pellet was washed twice with 10 volumes of water and then resuspended and digested with 0.1% of sodium dodecyl sulfate (SDS). We transferred the samples to vials containing 5 ml of Tritosol⁽¹⁷⁾ and the radioactivity associated with the digested pellet was counted in a scintillation spectrophotometer. The specific binding was determined incubating the membranes in the presence of the radioactive ligand and 1 mM glycine or 100 μM strychnine.

Displacement was assayed by incubating the tissue with either [³H]glycine or [³H]strychnine at 2 nM and the drug to be evaluated at 100 μM concentration. When displacement of the radioactive ligand was more than 60% of the specific binding, displacement curves were generated. This was done by incubating the tissue with 2 nM of the radioactive ligand and the displacer in the 10 nM to 100 μM range.

RESULTS

[³H]Glycine binding was linear in protein concentration range of 20–100 μg/ml and was independent of sodium (not shown). Binding of [³H]glycine was studied in the concentration range of 1 to 200 nM. [³H]Glycine binding in P1 membranes as well as in P2 membranes was saturable, showing in both cases high affinity (Fig. 1). The affinity constant (K_d) for P2 membranes (82 nM) is almost 7-fold greater than that of P1 (K_d = 12 nM), showing the same capacity: B_{max} = 3.06 pmol/mg protein for P1 and 3.15 pmol/mg protein for P2. It is remarkable that these affinities are very far from those of the carrier systems when were characterized in the same synaptosomal fractions.⁽¹⁴⁾

The displacement of specifically bound [³H]glycine was assayed with a set of drugs recognised as ligands of the strychnine-sensitive post-synaptic GlyR and several other molecules proposed to act on the strychnine-insensitive glycine site at the NMDA_R. Table I shows [³H]-glycine displacement by β-alanine (P1 = 79%, P2 = 92%), and L-serine (P1 = 96%, P2 = 72%), which are agonists of the strychnine-sensitive GlyR. Two recognized ligands of the glycine site at the NMDA_R, namely α-serine (P1 = 64%, P2 = 75%) and HA966 (P1 = 65%, P2 = 70%) also displaced [³H]-glycine. In the Table I it can also be seen that the postsynaptic GlyR receptor antagonists both strychnine and its analog 2-N-stry did not displace [³H]glycine from P1 or P2 membranes. The case remains the same for 7CK and 5,7 DCK, claimed as specific antagonists of glycine at the NMDA receptor.

The calculated IC₅₀ and n_H for [³H]glycine displacement by β-alanine, L-serine, α-serine and HA966 are shown in Table II. Note that for the membranes from each synaptosomal fraction the most efficient displacer was β-alanine followed by L-serine and α-serine ~ HA966 were much less potent (see Table II for values), a fact that will be discussed below. The n_H for all of these displacers in both synaptosomal fractions was approximately 1, indicating a 1:1 interaction between the radioactive ligand and the displacer.

Kinetics and Displacement of [³H]Strychnine Binding. The binding of [³H]-strychnine to synaptosomal membranes was studied in a concentration range from 1

[³H]Glycine and [³H]Strychnine Binding in Frog Retina

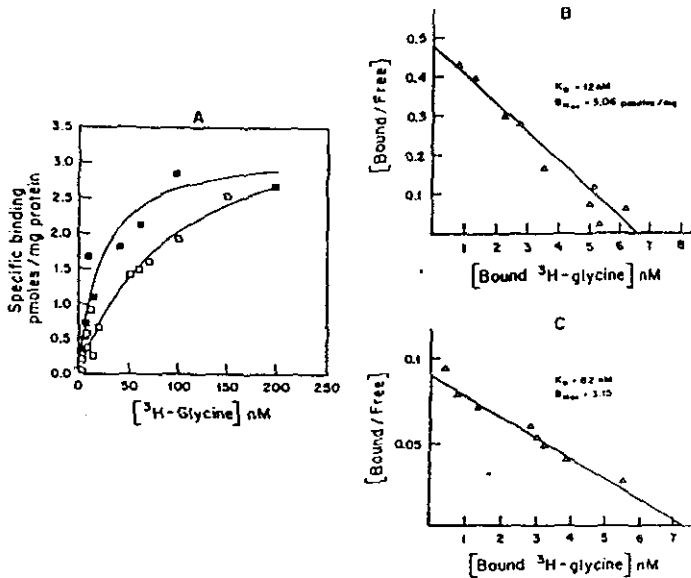


Fig. 1. Specific binding of [³H]glycine to synaptosomal membranes from P1 (■) and P2 (□) fractions. Binding was assayed as described under Experimental Procedures, by incubating membranes in the presence of increasing [³H]glycine concentrations. Specific binding was calculated with 1 nM glycine. Curves were drawn by aid of computational methods. B) Scatchard analysis from the data of P1 membranes, $r^2 = 0.977$ C) Scatchard analysis from the data of P2 membranes, $r^2 = 0.976$. Points are the mean of three experiments performed by duplicate, which did not differ more than 10%.

to 200 nM. The specific binding was found to be saturable (Fig. 2). Scatchard analysis from these data showed the presence of two sites with $K_D = 3.9$ nM and 18.7 nM in P1 membranes and 0.6 nM and 48.1 nM in P2 membranes. The Scatchard plots performed for the analysis of [³H]strychnine binding in P1 and P2 indicate that the two sites of binding in each fraction are completely independent (Fig. 2) and thus do not represent different affinity states of the same receptor.^(20,21) Besides, note that the lower affinity site for strychnine binding in each synaptosomal fraction is near from that one of glycine binding.

The displacement of [³H]strychnine was assayed with the same set of drugs as those used for glycine. Table III shows that in addition to strychnine, the only effective displacer of [³H]strychnine in both membrane fractions is 2-N-stry. Glycine, β -alanine, taurine and RU 5135 displace only 40% of the [³H]-strychnine in P2, and even less in P1. The calculated IC_{50} and n_H for the displacement of [³H]strychnine by 2-N-stry and RU 5135 are shown in table IV; it should be noticed that neither the IC_{50} nor the n_H could be determined for RU

5135 in P1 membranes, because this drug did not displace more than 50% of [³H]strychnine specific binding.

For the rest of the conditions the values for n_H indicate a 1:1 interaction between the radioactive ligand and the displacer, and are similar to other values reported for displacement of [³H]strychnine from the GlyR.⁽²²⁾ However, the IC_{50} for 2-N-stry in P1 (13.6 μ M) and P2 (1.4 μ M) membranes is very high compared with those obtained from displacement of [³H]strychnine in rat spinal cord synaptosomal membranes ($IC_{50} = 30$ nM, 22), suggesting that the strychnine binding site where 2-N-stry binds is different from those in mammalian spinal cord. The low displacement achieved by RU 5135, glycine, β -alanine and taurine is striking, since it has been reported that all of them can interact with the GlyR.^(22,23)

Since strychnine can block the bicuculline-sensitive GABA-evoked responses in some preparations and picrotoxin can partially block the glycine-evoked chloride current,⁽²⁴⁻²⁶⁾ we try to displace [³H]strychnine with both antagonists (bicuculline and picrotoxin) of the ionotropic GABA receptor, and with cis-amino-crotonic acid and trans-amino-crotonic acid known to act at the

Table 1. Percent of Displacement of [³H]Glycine Specifically Bound to Synaptosomal Membranes from Frog Retina*

Displacer	P2 membranes	P1 membranes
Glycine 1 nM	100	100
β-alanine 1 nM	79 ± 8 (3)	92 ± 5 (5) [†]
Taurine 1 mM	12 ± 7 (4)	36 ± 20 (4)
Picrotoxine 100 μM	9	n.d.
GABA 1 nM	10 ± 7 (3)	n.d.
Strychnine 100 μM	12 ± 6 (10)	16 ± 8 (8)
Bicuculline 100 μM	n.d.	n.d.
D-serine 100 μM	75 ± 8 (6)	64 ± 4 (5)
L-serine 100 μM	72 ± 9 (4)	96 ± 2 (4) [†]
HA 966 100 μM	70 ± 8 (6)	69 ± 8 (3)
7 CK 100 μM	23 ± 14 (3)	n.d. (3)
5,7 DCK 100 μM	28 ± 10 (4)	31 ± 18 (4)
2-N-stry 100 μM	44 ± 26 (3)	5 ± 3 (4)
CACA 100 μM	n.d.	n.d.
TACA 100 μM	n.d.	n.d.

*Membranes were incubated with 2 nM of [³H]glycine and displacement was assayed as described under Experimental Procedures. Specific binding was calculated with 1 nM glycine. Data are the mean ± SE from (n) experiments or from two experiments performed by duplicate. The individual mean values were subjected to analysis among them by Student's *t* test.

[†]*P* < 0.05, greater displacement than that achieved by rest of drugs. 7CK = 7-Chlorokynurenic acid; 5,7 DCK = 5,7-Dichlorokynurenic acid; CACA = cis-amino-erotic acid and TACA = trans-amino-erotic acid; GABA = γ-amino-butyric acid; 2-N-stry = 2-NH₂-strychnine; n.d. = not detected.

Table II. Parameters of Displacement of [³H]Glycine Specific Binding to Synaptosomal Membranes from Frog Retina*

	P2		P1	
	n _H	E _{50%} μM	n _H	E _{50%} μM
β-alanine	0.79	0.06	0.68	0.25
D-serine	0.85	12.8	1.05	23
L-serine	0.64	0.265	0.97	0.769
HA 966	0.85	10.9	1.2	23.9

*The parameters were calculated from displacement curves and Hill plots (not shown), which were subjected to analysis by computational methods, *r*² ≥ 0.900. Data were from three experiments described under Experimental Procedure performed by duplicate, and the means did not differ more than 10%.

Abbreviations as in Table I.

GABA receptor too. The displacement was only achieved by bicuculline and note that it displaced more [³H]strychnine in P2 than in P1 membranes, although the effect is not statistically significant. Also, notice a modest effect of 7CK and 5,7 DCK.

DISCUSSION

There are several differences regarding the neurotransmitters systems between amphibian and mammalian

retinas. As an example is the case that some molecules, as glycine, can act as neurotransmitters in both plexiform layers in amphibians, while in mammals its action is restricted to the inner plexiform layer.⁽¹⁾ It seems that glycine and strychnine-binding sites extend these particularities.

[³H]Strychnine has been the only radioactive ligand used to characterize the GlyR by binding studies. Until the discovery of glycine site at the NMDA_R,⁽¹³⁾ specific [³H]glycine binding studies were almost lacking, except for a few ones.⁽⁷⁷⁾ We found that both specific [³H]glycine and [³H]strychnine binding sites can be detected in the membranes of synaptosomal fractions isolated from frog retina. By several reasons, to be exposed below, we think that specific [³H]strychnine binding represents, besides the postsynaptic GlyR, another membrane protein.

First, we found two binding sites for [³H]strychnine in each one of the synaptosomal fractions. [³H]Strychnine binding has traditionally been used to localise the GlyR, and we know of no study that has shown the existence of more than one site.^(78,13,16) However, strychnine has two apparent affinities for the inhibition of glycine-evoked electrophysiological responses in mammalian cells in culture.⁽²⁸⁾ It is interesting that the high affinity strychnine binding site in P2 shows higher affinity for strychnine than in P1, and even more, a ten-fold higher affinity than in other regions of the central nervous system (CNS). A similar affinity for strychnine has been only found in the ganglion cells from the *spastic* mutant mouse retina⁽²⁹⁾ and in cultured medullary neurons.⁽²⁸⁾ The different affinities between P1 and P2 could signal the existence of different kind of receptors, moreover if we consider that displacement also differs. As an example, β-alanine (43%), taurine (46%), glycine (39%), and RU 5135 (53%) partially displace strychnine from P2 membranes. This partial displacement of [³H]strychnine in P2 against the lack of displacement in P1 may be due to the existence of the GlyR, displaced by β-alanine, D-serine, glycine, taurine and RU5135. Nevertheless, though the affinity and displacement differences, we think that the same kind of proteins are found within each synaptosomal fractions, while proportions vary between them: notice that in P2 B_{max} is ten-fold-higher than B_{max}. Likewise, we think that the low affinity binding site signals the GlyR in each synaptosomal fraction, whereas the high affinity binding site binds strychnine regardless of glycine and related aminoacids.

We only know of one kind of strychnine binding so resistant to glycine and analogs. Recently, it has been reported⁽³¹⁾ the binding of [³H]strychnine to rabbit renal proximal tubules which was neither displaced by glycine

[³H]Glycine and [³H]Strychnine Binding in Frog Retina

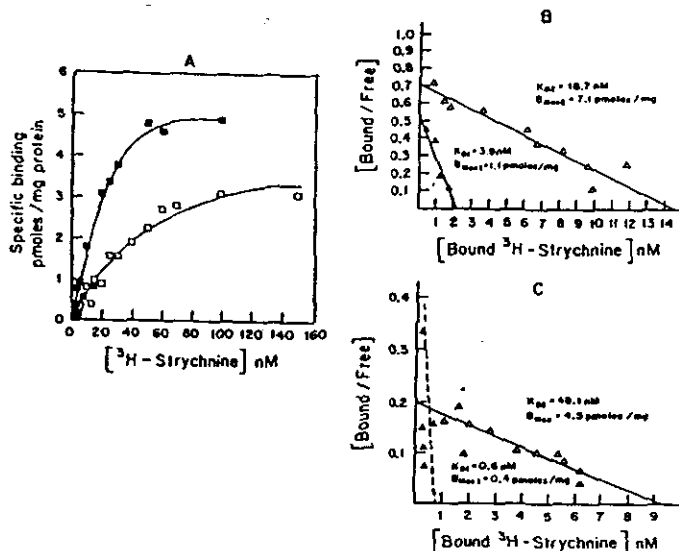


Fig. 2. Specific binding of [³H]strychnine to synaptosomal membranes from P1 (■) and P2 (□) fractions. Binding was assayed as described under Methods, by incubating membranes in the presence of increasing concentrations of [³H]strychnine. Specific binding was calculated with 100 μM strychnine. The curves were drawn by aid of computational methods. B) Scatchard analysis from the data of P1 membranes, showing the existence of two binding sites ($r_1^2 = 0.959$ and $r_2^2 = 0.958$) and C) Scatchard analysis from the data of P2 membranes, also showing two binding sites ($r_1^2 = 0.900$ and $r_2^2 = 0.954$). Points are the mean of three experiments performed by duplicate, which did not differ more than 10%.

Table III. Percent of Displacement of [³H]Strychnine Specifically Bound to Synaptosomal Membranes from Frog Retina*

Displacer	P2	P1
Strychnine 100 μM	100	100
Glycine 1 mM	39 ± 3 (3)	21 ± 10 (12)
β-alanine 1 mM	43 ± 4 (9) [†]	12 ± 5 (8)
Taurine 1 mM	46 ± 7 (7) [†]	17 ± 6 (9)
Picrotoxine 100 μM	7 ± 3 (3)	9 ± 2 (3)
GABA 1 nM	9 ± 4 (4)	5 ± 3 (5)
Bicuculline 100 μM	50 ± 11 (4)	20 ± 6 (4)
D-serine 100 μM	12 ± 7 (3)	7
D-serine 100 μM	14	n.d.
HA 966 100 μM	13	n.d.
7 CK 100 μM	17	18 ± 6 (3)
5,7 DCK 100 μM	22 ± 13 (3)	11 ± 9 (3)
2-N-stry 100 μM	93 ± 8 (4)	72 ± 10 (5) [†]
RU 5135 100 μM	53 ± 12 (3) [†]	11 ± 8 (4)
CACA 100 μM	n.d.	n.d.
TACA 100 μM	n.d.	n.d.

*Membranes were incubated with 2 nM [³H]strychnine and displacement was assayed as described under Methods, specific binding was calculated in the presence of 100 μM strychnine. Data are the mean ± SE from (n) experiments or from two experiments, performed by duplicate, individual mean values were subjected to Student's *t* test.

[†]P < 0.05 greater displacement than that achieved by any of the rest of drugs.

[‡]P < 0.05 greater displacement than that achieved by the same drug in P1 membranes.

Abbreviations as in Table I.

Table IV. Parameters of Displacement of [³H]Strychnine Specific Binding in Frog Synaptosomal Membranes*

Displacer	P2		P1	
	n_H	E_{C50} μM	n_H	E_{C50} μM
2-N-stry	0.83	1.4	0.88	13.6
RU 5135	0.25	14.9	n.d.	n.d.

*Parameters were calculated from displacement curves and Hill plots (not shown) which were subjected to analysis by computational methods ($r^2 \geq 0.94$). Data were from three experiments performed by duplicate, the means did not differ by more than 10%.

Abbreviations as in Table I.

nor related aminoacids. Though the binding was of very low affinity ($K_{11} = 0.87$ mM) compared with that in P1 and P2 membranes, it was also showed that bicuculline did inhibit the binding. This could indicate a resemblance between the function of those sites and these ones detected in frog retina. The bicuculline action over strychnine binding and the modest effect 7CK and 5,7 DCK had, could probably be explained on the basis of the structural features of all these three molecules which, like strychnine, are ringed molecules. Indeed it has been proposed that strychnine interacts with the GlyR through

one of its ring moieties,⁽³²⁾ hence it is very likely that any other interaction with any other membrane protein that strychnine it has could be mediated in this way. As an example, [³H]strychnine binding to spinal cord synaptosomal membranes is inhibited by DNQX, a three-ringed molecule which is an AMPA/kainate receptor antagonist.⁽³³⁾

The [³H]glycine binding data from this study are very similar to those collected for the binding of [³H]glycine in synaptosomal membranes from brain and spinal cord of mammals^(17,34) and chick retina,⁽³⁵⁾ where the K_{11} values are between 40 and 200 nM. More important is the fact that the affinity for glycine binding in each synaptosomal fraction is very near from the lower affinity site for strychnine binding. This suggests that glycine and strychnine share a site within the frog retina.

The displacement of [³H]glycine from P1 and P2 membranes by L-serine and β -alanine indicates that the site glycine and strychnine share could it be an isoform of the GlyR, overmost if we look the I_{50} and n_H that both L-serine and β -alanine showed in displacing glycine, alike to those reported formerly for the displacement of [³H]strychnine in mammalian spinal cord.⁽²¹⁾

On the other hand, displacement by D-serine and HA966 are consistent with binding at the glycine site of the NMDA receptor.⁽³⁶⁾ However, we could not displace [³H]glycine neither by 7CK nor 5,7 DCK, drugs that interact with the strychnine-insensitive glycine site at the NMDA receptor in all the tissues so far characterized.⁽¹⁷⁻²⁰⁾ Even more, we could not modulate the [³H]glycine binding by glutamate, nor modulate the [³H]glutamate NMDA-sensitive binding by glycine (data not shown). It must be said that the presence of the NMDA_R has been detected in the retina of several species: the mRNA's from NMDA_R subunits have been found in mouse,⁽⁴⁰⁾ glycine potentiation of NMDA-evoked responses has been shown in fish,⁽⁴¹⁾ strychnine-insensitive and NMDA-associated [³H]glycine binding has been measured in chick retina,⁽³⁵⁾ and NMDA-evoked [³H]acetylcholine release in rabbit retina requires the glycine site of the NMDA_R.⁽⁴²⁾ After these data, it would be expected that the glycine site of the NMDA_R in the frog retina be alike to the rest of the vertebrates. Our data suggest that if present, this one is extreme atypical, which we think is not the case.

Alternatively, we think that glycine also has two binding sites as does strychnine, though in glycine case the sites can not be resolved by glycine affinity, but by the analogs bound to each site: one site binds L-serine and β -alanine and thus represents GlyR. Likewise, the possibility that one of the glycine binding sites pertains to GlyR explains why glycine, β -alanine, L-serine, tau-

rine and RU-5135 did partially displace strychnine from P2 membranes. The another one protein which binds glycine also does bind D-serine and HA966 but it is not associated to NMDA_R after the evidence exposed above.

If it is not the NMDA_R, what is the nature of the another one glycine-binding site? There is another kind of protein which binds glycine in a strychnine-insensitive way. This is the electrophysiologically detected α_7 isoform of the α subunit of the GlyR,⁽⁴³⁾ although the mRNA of this subunit was not found in the rat retina.⁽⁴⁴⁾ Aside this, the localisation of the GlyR within the frog retina has not been tried thoroughly. The immunocytochemical presence of GlyR in frog retina is restricted to the localisation of gephyrin,⁽⁴⁾ but this protein could not be exclusive of the GlyR.⁽⁴⁵⁾ Other studies using immunocytochemistry for localise the rest of subunits have been performed only for mammals.⁽³⁾ The case is the same for *in situ* hybridization studies.⁽⁴⁴⁾ Thus, the localisation of atypical subunits of the GlyR in frog retina, probably alike to α_7 of mammals, must not be discounted. Finally, we know of no study measuring ³H-glycine binding to GlyR, we mean to purified GlyR, thus displacement of ³H-glycine to this protein is not documented.

On the other hand, cellular localisation of [³H]glycine uptake sites is restricted to amacrine cells⁽⁴⁶⁾ and, to our knowledge, there are no autoradiographical data over [³H]glycine or [³H]strychnine binding sites in any region of frog CNS. It seems to be that these kind of data must be generated for frog retina, in order to compare with biochemical data.

Our results demonstrate the presence of high affinity binding sites for glycine and for strychnine in frog retinal synaptosomal membranes. Some of the [³H]glycine binding sites, as well as some of [³H]strychnine, represent the strychnine-sensitive postsynaptic GlyR. However, in the frog retina other glycine and strychnine sites are present. These show pharmacological characteristics in such a way that we can not assign to any known site.

ACKNOWLEDGMENTS

J.-A. Pérez-León was a fellowship from DGAPA-UNAM and CONACYT. We wish to acknowledge to Mr. Gustavo Sánchez-Chávez by technical assistance.

REFERENCES

1. Marc, R. E. 1989. The role of glycine in mammalian retina. *Progress Retinal Res.* 8:119-158.

[³H]Glycine and [³H]Strychnine Binding in Frog Retina

2. Voaden, M. J. 1976. GABA and glycine as retinal transmitters, in Bonning, S. L. (ed) Transmitters in the visual process. Pergamon Press, Oxford, Pages 107-126.
3. Grünert, U., and Wässle, H. 1993. Immunocytochemical localization of Glycine receptor in the mammalian retina. *J. Comp. Neurol.*, 335:523-537.
4. Jäger, J., and Wässle, H. 1987. Localization of glycine uptake and receptors in the rat retina. *Neurosci. Lett.*, 75:147-151.
5. Smiley, J. F., and Yazulla, S. 1990. Glycinergic contacts in the outer plexiform layer of the *Xenopus laevis* retina characterized by antibodies to glycine, GABA, and GlyR. *J. Comp. Neurol.*, 299: 375-388.
6. Yazulla, S., and Studholme, K. 1991. GlyR immunoreactivity in retinal bipolar cells is postsynaptic to glycinergic and GABAergic AC synapses. *J. Comp. Neurol.*, 310:11-20.
7. Borbe, H. Müller, W. E., and Wöllert, U. 1981. Specific strychnine binding associated with glycine receptor in bovine retina. *Brain Res.*, 205:131-139.
8. Schaeffer, J. M., and Anderson, S. 1980. Identification of strychnine binding sites in the rat retina. *J. Neurochem.*, 36:1597-1600.
9. Miller, R. F., Frunke, T. E., Slaughter, M., and Dacheux, R. F. 1981. Physiological and pharmacological basis of GABA and glycine actions on neurons of mudpuppy retina. *J. Neurophysiol.*, 45: 743-804.
10. Stockton, R. A., and Slaughter, M. M. 1991. Depolarizing actions of GABA and glycine on amphibian horizontal cells. *J. Neurophysiol.*, 65:680-692.
11. Gilbertson, T. A., Borges, S., and Wilson, M. 1991. The effects of glycine and GABA on isolated horizontal cells from tiger salamander retina. *J. Neurophysiol.*, 66:2002-2013.
12. Borges, S., and Wilson, M. 1991. Dual effects of glycine on horizontal cells of the tiger salamander retina. *J. Neurophysiol.*, 66: 1993-2001.
13. Johnson, J. W., and P. Ascher P. 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325: 529-531.
14. Salceda, R. 1989. Uprake and K⁺-stimulated release of ¹⁴C-glycine from frog retinal synaptosomal fractions. *Neurochem. Res.*, 14: 49-54.
15. Kessler, M., Terramani, T., Lynch, G., and Baudry, M. 1989. A glycine site associated with NMDA receptor: Characterization of a new class of antagonists. *J. Neurochem.*, 52:1319-1328.
16. Young, A. B., and Snyder, S. H. 1973. Strychnine binding associated with glycine receptor of the central nervous system. *Proc. Natl Acad. Sc. U.S.A.*, 70:2832-2836.
17. Young, A. B., and Snyder, S. H. 1974. The glycine synaptic receptor: evidence that strychnine binding is associated with the ionic conductance mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, 71: 4002-4005.
18. Fricke, U. 1975. Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Analyt. Biochem.*, 63:555-558.
19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
20. Unnerstall, J. R. 1990. Computer-assisted analysis of binding data. Pages 37-68 in Yamamura, H. I., Enna, S. J. and M. Kular (eds) Methods in neurotransmitter receptor analysis. Raven Press, New York.
21. Segel, I. H. Enzyme Kinetics. John Wiley & Sons. USA. 1975.
22. Marvizon, J. C., Vazquez, J., Garcia-Calvo, M., Mayor Jr. F., Ruiz-Gomez, A., Valdivieso, F., and Benavides, J. 1986. The glycine receptor: pharmacological studies and mathematical modelling of the allosteric interaction between glycine- and strychnine-binding sites. *Mol. Pharmacol.*, 30:590-597.
23. Ruiz-Gomez, A., Garcia-Calvo, M., Vazquez, J., Marvizon, J. C., and Mayor Jr. F. 1989. Thermodynamics of the agonist and antagonist interaction of the strychnine-sensitive GlyR. *J. Neurochem.*, 52:1775-1780.
24. Lewis, D. A., and D. S. Faber. 1993. GABA responses and their partial occlusion by glycine in cultured rat medullary neurons. *Neuroscience*, 52:83-96.
25. Tauck, D. L., Frosch, M. P., and S. A. Lipton. 1988. Characterization of GABA and glycine induced currents of solitary rodent retinal ganglion cells in culture. *Neuroscience*, 27:193-203.
26. Dichter, M. A. 1980. Physiological identification of GABA as the inhibitor transmitter for mammalian cortical neurons in cell culture. *Brain Res.*, 190:111-121.
27. Kishimoto, H., Simon J. R., and Aprison, M. H. 1981. Determination of the equilibrium dissociation constants and number of glycine binding sites in several areas of the rat central nervous system, using a Na⁺ independent system. *J. Neurochem.*, 37:1015-1024.
28. Lewis, C. A., Ahmed, Z., and Faber, D. S. 1989. Characteristics of glycine-activated conductances in cultured medullary neurons from embryonic rat. *Neurosci. Lett.*, 96:185-190.
29. Stone, C., and Pinto, L. H. 1992. Receptive field organization of retinal ganglion cells in the spastic mutant mouse. *J. Physiol.*, 456: 125-142.
30. Barron, S. E., and Guth, P. S. 1987. Uses and limitations of strychnine as a probe in neurotransmission. *Trends Pharmacol. Sci.*, 8: 204-206.
31. Miller, G. W., and Schnellman, R. G. 1993. A novel low-affinity strychnine binding site on renal proximal tubules: role in toxic cell death. *Life Sci.*, 53:1203-1209.
32. Aprison, M. H. 1990. The discovery of the neurotransmitter role of glycine. in Olesen, O. P. and Storm-Mathisen, J. (eds) Glycine neurotransmission. John Wiley & Sons, New York. pp: 1-24.
33. Pollan, L. M., and Powell, R. J. 1992. Comparison of binding at the strychnine sensitive (inhibitory GlyR) and strychnine-insensitive (NMDA receptor) glycine binding. *Neurosci. Lett.* 148:197-201
34. Marvizon, J. C., Lewin, A. H., and Skolnick, P. 1989. 1-amino-cyclo-propan-carboxylic-acid: a potent and selective ligand of the glycine modulatory site of the NMDA receptor complex. *J. Neurochem.*, 52:992-994.
35. Boye, K. J., Skolnick, P., Raber, J., Fletcher, R. T., and Chader, G. 1992. Strychnine-insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: Characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. *Neurochem. Int.*, 20:473-486.
36. Foster, A. C., and Kemp, A. J. 1989. HA-966 antagonizes NMDA receptor through a selective interaction with the glycine modulatory site. *J. Neurosci.*, 9:2191-2196.
37. Kleckner, N. W., and Dingledine, R. 1989. Selectivity of quinoxalines and kynurenes as antagonists of the glycine site on the NMDA receptors. *Mol. Pharmacol.*, 36:430-436.
38. Hurt, S. D., and Baron, B. M. 1991. ³H-5,7-dichlorokynurenic acid, a high affinity ligand for the NMDA receptor glycine regulatory site. *J. Receptor Res.*, 11:215-220.
39. Saransaari, P. J., and Oja, S. S. 1993. Strychnine-insensitive glycine binding to cerebral cortical membranes in developing and ageing mice. *Mechanisms Ageing Develp.*, 72:57-66.
40. Watanabe, M., Mishina, M., and Inoue, Y. 1994. Differential distributions of the NMDA receptor subunit mRNA's in the mouse retina. *Brain Res.*, 634:328-332.
41. Yazejian, S., and Fain, L. 1992. Excitatory aminoacids receptors on isolated ganglion-cells from the goldfish. *J. Neurophysiol.*, 67: 94-107.
42. Linn, D. M., and Massey, S. C. 1991. Acetylcholine release from rabbit retina mediated by NMDA receptors. *J. Neurosci.*, 11:123-133.
43. Kuhse, J., Schmieden, V., and Betz, H. 1990. A single aminoacid exchange alters the pharmacology of neonatal rat glycine receptor subunit. *Neuron*, 5:867-873.
44. Greferath, U., Brandsstätter, J. H., Wässle, H., Kirsch, J., Kuhse, J., and Grünert, U. 1994. Differential expression of glycine receptor subunits in the retina of the rat: a study using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Visual Neurosci.*, 11:721-729.

Prior, P., Schmitt, B., Grenningloh, G., Pribilla, I., Murthaup, G., Beryreuther, K., Maulet, Y., Werner, P., Langosch, D., Kirsch, J., and Betz, H. 1991. Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron*, 8:1161-1170.

46. Pourcho, R. G., and Goebel, D. J. 1990. Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine-containing neurons in the retina. In Ottersen, O. P. and Storm-Mathisen, J. (eds) Glycine neurotransmission. John Wiley & Sons, New York, pp. 355-390.

OBJETIVOS

Se tiene la evidencia de que, dentro de la retina de la rana, la glicina se une a receptores diferentes al RGly típico de la médula espinal, de forma que el objetivo general de este trabajo fue caracterizar a los receptores de glicina en la retina de la rana.

Para lograr lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la sensibilidad farmacológica de los sitios de unión de glicina-³H y estircnina-³H que no forman parte del receptor postsináptico típico
- Estudiar la localización de las subunidades del receptor postsináptico de glicina mediante inmunohistoquímica.

METODO EXPERIMENTAL

Ensayos de unión específica

Unión específica de L-glutamato-³H

Dentro del receptor ionotrópico de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA_R), existe un sitio en donde se une la glicina y tiene por efecto aumentar la afinidad del glutamato, en este sitio la estricnina no actúa como inhibidor y se conoce como sitio de glicina insensible a estricnina (Fletcher *et al*, 1990). Los datos obtenidos por Pérez-León y Salceda, (1995, Introducción, antecedentes, anexo) no descartaron la posible existencia de un sitio de esta naturaleza dentro de las membranas sinaptosomales de la retina de la rana, pues se carecía de la evidencia de la interacción directa entre la glicina y el glutamato. Para evaluar esta posible interacción en el tejido, se midió la unión de glicina-³H en presencia de glutamato y de glutamato-³H en presencia de glicina. Realizamos este experimento en membranas sinaptosomales de la retina de la rana y en membranas sinaptosomales del telencéfalo de la rata, en donde el co-agonismo es claro (Kessler *et al*, 1989).

Las membranas sinaptosomales de la retina de la rana (*Rana pipiens*) se obtuvieron mediante la técnica descrita por Pérez-León y Salceda (1995), *grosso modo*, se aislaron las retinas de ranas adaptadas a la oscuridad, se homogenizó al tejido en sacarosa 0.28 M-MgSO₄ 100 µM, por centrifugación diferencial se eliminó la fracción celular (botón a 500 g), se aisló la fracción sinaptosomal P1 (botón a 11 000 g) y la fracción sinaptosomal P2 (botón a 20 000 g). Estas fracciones se han caracterizado por microscopía electrónica por Salceda (1989), la fracción sinaptosomal P1 contiene terminales de fotorreceptores, en donde se encuentra la estructura conocida como listón sináptico, formado por proteínas del citoesqueleto y vesículas sinápticas; en la fracción sinaptosomal P2 se encuentran principalmente sinaptosomas de tamaño convencional. La presencia del listón sináptico confiere una flotabilidad menor a las terminales de los fotorreceptores, lo que facilita la separación de las fracciones sinaptosomales por centrifugación diferencial.

Cada fracción sinaptosomal se sometió a choque osmótico en Tris-HCl 50 mM pH 7.4, se sedimentaron las membranas a 71 000 g y se lavaron 5 veces, repitiendo la centrifugación a 71 000 g. Luego se incubaron en 20 veces el peso del tejido inicial en volumen de Tris-HCl 50 mM pH 7.4 a 30°C durante 30 min y se sedimentaron a 71 000 g, finalmente se congelaron a -20°C hasta el momento del experimento.

Las membranas sinaptosomales del telencéfalo de la rata se aislaron de acuerdo al método descrito por Kessler y colaboradores (1989). En resumen, se homogenizó al telencéfalo en sacarosa

0.32 M-acetato 1 mM pH 7.4, se aisló la fracción sinaptosomal por centrifugación diferencial (1000 g y 35 000 g), se obtuvieron las membranas por choque osmótico y se sedimentaron por centrifugación a 40 000 g.

El glutamato-³H (56.6 Ci/mmola) se utilizó a una concentración final de 10 nM, la unión específica se obtuvo desplazando con glutamato 1 mM, y la unión asociada al NMDA_R se determinó con NMDA 1 mM y con ácido amino-fosfono-valérico (AP-5) 1 mM. Es importante recalcar que el desplazamiento obtenido con glutamato 1 mM señala todos los receptores a los que se une el glutamato-³H, entre ellos los diferentes receptores ionotrópicos de este aminoácido excitador, mientras que el desplazamiento con NMDA ó AP-5- señala solamente al subtipo NMDA

Desplazamiento de la unión de glicina-³H y de estriquina-³H

En estudios previos (Pérez-León y Salceda, 1995, Introducción, Antecedentes, anexo) demostramos que los sitios de unión de estriquina-³H y los de glicina-³H pueden distinguirse por que la estriquina-³H presenta dos afinidades y por la carencia de inhibición entre una y otra molécula. Concluimos que existen dos tipos de proteínas membranales donde la glicina y la estriquina se unen con alta afinidad, uno de ellos es el RGly típico, quedaría por delinear la identidad del tipo restante.

Los experimentos de desplazamiento de ligandos radioactivos se plantearon para caracterizar farmacológicamente esos sitios de unión de glicina-³H y estriquina-³H, el espectro de moléculas utilizadas en estos experimentos incluyó a ligandos de otros receptores pertenecientes a la familia de los receptores ionotrópicos, a antagonistas de intercambiadores iónicos y de transportadores de membrana, con el fin de detectar la interacción de nuestros ligandos radioactivos, si la hubiera, con otras proteínas de membrana además del RGly.

El desplazamiento de estriquina-³H 2 nM se determinó en presencia de las siguientes drogas: hexametonio, (ligando del receptor nicotínico de acetilcolina), ácido niflúmico, DIDS (inhibidores del intercambiador aniónico de la membrana plasmática del eritrocito de mamífero), sarcosina (inhibidor del transportador de alta afinidad de glicina), todas a 1 mM; a 100 µM la 2,3 dihidro-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)-quinoxalina-2,3-diona (NBQX, inhibidor de los receptores ionotrópicos de glutamato) y el ácido 5, 7 diclorokimurénico (5,7-DCK), ligando del sitio de la glicina insensible a estriquina en el NMDA_R. El desplazamiento de glicina-³H se midió con las drogas sarcosina, NBQX y hexametonio.

Inmunohistoquímica

Animales

Se utilizaron ratas pigmentadas (*Rattus norvegicus*, cepa Long Evans) y ranas. Adaptamos y sacrificamos a los animales en la oscuridad, bajo las mismas condiciones disectamos los globos oculares, los que sumergimos en paraformaldehído (PFA) 4%, amortiguado a pH 7.4 con fosfato de potasio 0.1 M (PB) durante 30 min, después hemisectamos y fijamos a la copa óptica durante 2 horas más en la misma solución. Posteriormente lavamos al tejido en NaCl 0.9%-PB (PBS) y se preparó para congelación sumergiendo en concentraciones crecientes de sacarosa (10, 20 y 30%)-PB, permaneciendo toda una noche (on) en sacarosa 30%-PB.

Las retinas de la rana y de la rata se colocaron en un sólo bloque y se cortaron por congelación, en secciones verticales de 10 μ m, se colectaron en portaobjetos cubiertos de gelatina y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Anticuerpos.- Se utilizó el anticuerpo monoclonal (mAb) 7a (Boehringer), que reconoce a la subunidad de 93 kDa (gefirina) del RGly, y el mAb 4a, que reconoce a las subunidades α (en todas sus variantes génicas conocidas, α 1- α 4) y β . Estos mAb's han sido caracterizados (Pfeiffer *et al*, 1984), el mAb 4a fue una donación del Dr. H. Betz, Max Planck Institut für Hirnforschung, Frankfurt, Alemania.

Se utilizaron además los anticuerpos policlonales Ab RGly, dirigido contra el RGly purificado de la médula espinal de la rata, y el Ab 384, dirigido contra un péptido sintético correspondiente a la secuencia de aminoácidos 384-391 de la subunidad α de la médula de la rata. Cada anticuerpo policlonal proviene de suero de conejo, reconocen a una proteína con peso molecular equivalente a la subunidad α del RGly, conforme han sido caracterizados por Ruíz-Gómez y colaboradores (1991) y fueron donados por el Dr. F. Mayor (Universidad Autónoma de Madrid, España).

Incubación con anticuerpos y detección.- En todos los experimentos por describir utilizamos secciones alternas para evaluar a cada anticuerpo simultáneamente. Los cortes se incubaron en acetona a -20°C para permeabilizar al tejido, se secaron a temperatura ambiente (t.a) y se rehidrataron en NaCl 0.131 M- Tris-HCl pH 7.6- Tritón X-100 0.1% (TBS). Los cortes se incubaron en una solución de suero normal de cabra 20%-TBS (t.a, 30 min) e inmediatamente después con la solución del anticuerpo, on a 4°C. Las diluciones de anticuerpos primarios fueron: mAb 7a (contra gefirina) 1:10, mAb 4a, AbRGly y Ab 384 1:100, todos preparados en TBS. Al finalizar esta incubación, se lavó con TBS (10 min, 2 veces (2x)), se detectó la presencia del mAb 4a con IgG chivo vs ratón acoplada a fosfatasa alcalina

(AP) y la de los anticuerpos policlonales con IgG chivo vs conejo-AP (SIGMA), incubando a los cortes durante 2 hs, t.a. Cada tipo de IgG se utilizó diluida 1:100 en TBS. La actividad de fosfatasa alcalina (AP) se detectó con 5-bromo-4-cloro-indolil-fosfato (BCIP, Boheringer) como sustrato y nitro-azul tetrazolio (NBT, SIGMA) como cromógeno, en presencia de levamisol, utilizado como inhibidor de las fosfatasas endógenas, en un amortiguador NaCl-Tris 0.1 M- MgCl₂ 50 mM, pH 9.5. La reacción se vigiló bajo microscopía de luz y se detuvo sumergiendo a los cortes en agua destilada.

Los cortes incubados con el mAb 7a se sometieron a la detección de este anticuerpo por el método de la biotina avidina-peroxidasa: 2 horas a t.a en IgG chivo vs ratón acoplada a biotina, 1:100 en TBS, se lavaron (10 min 2x) y se incubaron en avidina-peroxidasa 1:1000-PBS 1 h, t.a. La actividad enzimática de la peroxidasa se reveló utilizando H₂O₂ 0.01% como sustrato y diaminobencidina (DAB) 0.05% como cromógeno en un amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.6. La reacción se vigiló bajo microscopía de luz, y se detuvo sumergiendo a los cortes en agua destilada.

En experimentos con marcaje doble, se incubó a los cortes con un mAb dirigido contra la suletasa de glutamina (Chemicon 1:500) y con el Ab RGly o el Ab 384. En estos experimentos se utilizaron como anticuerpos secundarios IgG vs ratón acoplada a cianometil-indocianina (Cy3, fluorescencia roja, Calbiochem) e IgG vs conejo acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC, fluorescencia verde, SIGMA).

Todos los anticuerpos secundarios se pre-absorbieron con suero de rata. En cada serie de experimentos se incubaron como control cortes con suero normal de cabra al 20%-TBS, en paralelo con los cortes incubados con los anticuerpos primarios, este método resultó siempre en la carencia de señal. Al final de cada experimento los cortes se cubrieron con glicerol 70% y se analizaron bajo microscopía de contraste interferencial (Nomarski) o microscopía de fluorescencia.

Electroforesis preparatoria e inmunotransferencia.- Se obtuvieron membranas sinaptosomales de la retina de la rana (Pérez-León y Salceda, 1995, ver arriba) y de médula espinal de rata de acuerdo con el método descrito por Young y Snyder (1973). Las proteínas de las membranas sinaptosomales se separaron en geles reductores de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio, de acuerdo con el método descrito por Laemli (1971). Los geles se transfirieron durante toda una noche a nitrocelulosa (BioRad), con el uso de un amortiguador Tris 25 mM-glicina 192 mM-metanol 20%. Al término de la transferencia, se tiñó a las membranas de nitrocelulosa con rojo de Ponceau 0.5%-ácido acético 2%, se señaló la posición de los patrones de peso molecular de intervalo amplio (BioRad) y se separaron del resto de los carriles.

La membranas de nitrocelulosa con las muestras se bloquearon durante una hora en leche descremada 5%- EDTA 2 mM en NaCl 500 mM- Tris 20 mM (TBS) y luego se incubaron durante toda una noche en una de las soluciones con anticuerpos: mAb 7a 1:10 y mAb 4a 1:500; Ab RGly 1:100 y Ab 384 1:50, diluidos en TBS. La incubación con los anticuerpos finalizó lavando en Tween 20 (BioRad) al 0.5%-TBS, 10 min 3x.

La incubación con los anticuerpos secundarios fue por dos horas a t.a. Para los anticuerpos policlonales se utilizó IgG chivo vs conejo acoplada a fosfatasa alcalina (AP) 1:100-TBS, 2 hs a t.a. Se lavó a la nitrocelulosa en Tween 20-TBS, 10 min, 3x y se preincubó 15 min en Tris 100 mM-NaCl 100 mM- MgCl₂ 50 mM pH 9.5, luego se añadió una mezcla de BCIP, NBT y levamisol endógenas) para revelar la actividad de AP, y se detuvo la reacción con agua destilada.

Las membranas de nitrocelulosas incubadas con los mAb's 7a y 4a se incubaron en IgG chivo vs ratón acoplada a biotina, diluida 1:100-TBS, dos horas a t.a., se lavaron 10 min 3x en Tween 20-TBS y se incubaron una hora en avidina-peroxidasa 1:1000-TBS. La incubación finalizó lavando en TBS 10 min 3x y posteriormente se preincubó a la nitrocelulosa en NaCl 0.9%-fosfatos 0.1 M pH 7.4 (PBS) 15 min, se agregó al medio H₂O₂ 0.01%, DAB 0.05% para revelar la actividad de peroxidasa, la reacción se detuvo lavando en agua destilada.

Inmunocitoquímica de células gliales aisladas de la retina de la rana.

Se adaptó a las ranas a la oscuridad durante un período de más de 2 horas. Bajo las mismas condiciones, se les decapitó y se extrajeron las retinas en una solución Ringer, amortiguada con bicarbonato de sodio a pH 7.4, en la que se lavó al tejido para posteriormente transferirlo al medio DME-70%, con papaína (8.5 U/ml) pre-activada con L-cisteína 1 mM-EDTA 2mM. Se incubó al tejido durante 30 min a 31°C, la incubación se detuvo lavando al tejido con Ringer Krebs-bicarbonato, después de lo cual se incubó en una solución de ARNasa 50 U/ml-medio DME 70%, a 31°C 30 min. La incubación se detuvo lavando de nuevo con Ringer-bicarbonato, a partir de este punto se disoció a las células mecánicamente.

Las células se disociaron mecánicamente, a través de la boca de una pipeta Pasteur, se permitió sedimentar durante 5 min y se colectó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió un mínimo de 5 veces, recolectando siempre el sobrenadante y conservando aquellos que presentaran enriquecimiento en células de Müller, que se reconocieron por su morfología característica (ver figura 11).

La fracción de células de Müller se fijó con PFA-4%-PB durante 15 min, se lavó por centrifugación a 500 g y se resuspendió a las células con PB, repitiendo el procedimiento una vez. Las células de Müller se montaron en portaobjetos cubiertos con gelatina y en éstos se realizó la inmunocitoquímica, siguiendo el mismo procedimiento que para los cortes histológicos, además de que incluimos el uso de un mAb contra vimentina, 1:100-TBS (SIGMA).

RESULTADOS

Ensayos de unión específica

Unión de glutamato-³H

La interacción entre la glicina y el glutamato dentro de las membranas de P1 y P2 se muestra, respectivamente, en las figuras 1 y 2. La unión de glutamato-³H es de magnitud similar en condiciones control y en un medio con 1 mM de glicina, es de notar que se obtuvo unión específica de glutamato-³H sólo al desplazar con glutamato 1 mM, pero no con NMDA ni con AP-5, indicando que, en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana, el glutamato-³H se une a receptores del tipo no-NMDA. Por su parte, la unión de glicina-³H es equivalente con y sin glutamato.

En la figura 3 se muestra el efecto de la glicina 1 mM sobre la unión de glutamato-³H en las membranas sinaptosomales del telencéfalo de la rata, aquí la glicina sí aumentó la unión al NMDA_R, como puede concluirse por el incremento en la unión específica con NMDA y con AP-5. Este dato demuestra que nuestro método detecta la presencia del NMDA_R en el tejido en que se presenta (por el desplazamiento del glutamato-³H con NMDA y AP-5) y que la afinidad del glutamato-³H por este receptor se incrementa por efecto de la glicina.

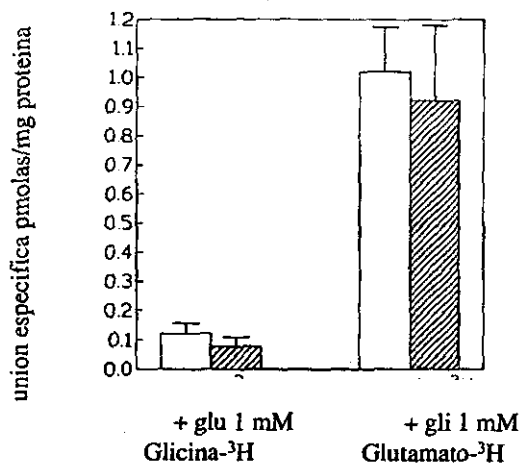


Figura 1.- Unión específica de glicina-³H y glutamato-³H en las membranas de la fracción sinaptosomal P1 de la retina de la rana. La unión específica para cada ligando radioactivo se midió en condiciones control (barras blancas) ó en presencia del otro ligando frío (barras diaagonales), los datos son el promedio \pm e.s. de 3 experimentos realizados por triplicado.

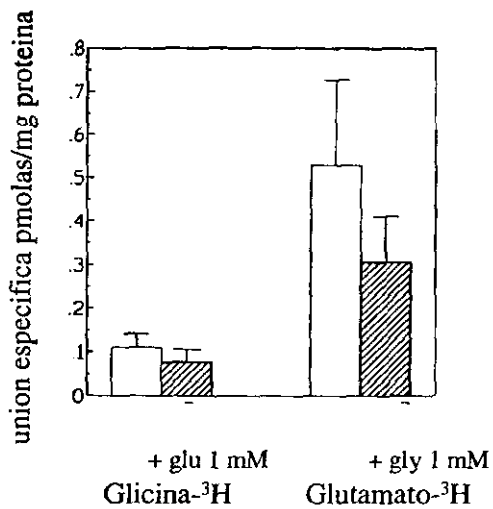


Figura 2.- Unión de glicina-³H y glutamato-³H en las membranas de la fracción sinaptosomal P2 de la retina de la rana. La unión de cada ligando frío se determinó en condiciones control (barras blancas) y en presencia del otro ligando frío (barras con diagonales), los datos son el promedio de 3 experimentos \pm e.s.

membranas sinaptosomales de la corteza

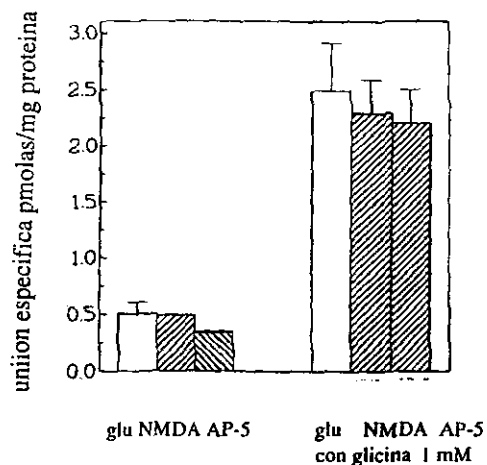


Figura 3.- Unión específica de glutamato-³H en las membranas sinaptosomales del telencefalo de la rata. La unión específica se determinó con glutamato 1 mM y con NMDA ó AP-5 para determinar la fracción correspondiente al NMDA_R. La unión específica se midió en presencia de glicina 1 mM, que aumentó la unión del glutamato-³H al NMDA_R, los datos son el promedio +/- el e.s. de 3 experimentos realizados por triplicado.

Desplazamiento de la unión de glicina-³H y estircina-³H

En la figura 4 se muestra que la estircina-³H se desplazó a un nivel estadísticamente significativo por efecto del NBQX y el 5,7-DCK, pero únicamente en las membranas de P2 (prueba *t* de Student, $p < 0.05$). La sarcosina, el DIDS y el ácido níflúmico carecieron de efecto sobre la unión de estircina radioactiva.

La figura 5 muestra el desplazamiento de la unión de glicina-³H por la sarcosina, el hexametonio y el NBQX, de entre estas drogas, sólo la sarcosina desplazó a la glicina-³H en magnitud significativa estadísticamente y el efecto se restringió a la fracción P2.

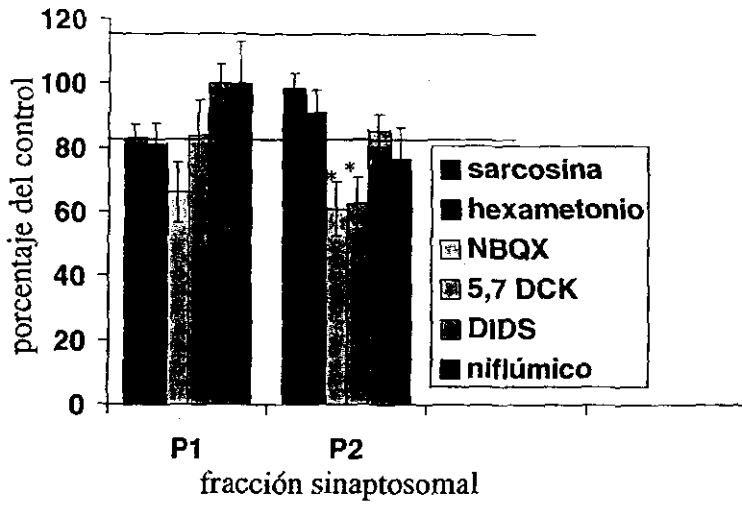


Figura 4.- Unión de estricnina-³H en presencia de diferentes drogas probadas como desplazadores, las líneas horizontales marcan el intervalo de variabilidad en estos experimentos (\pm 17%, se expresó el error estándar de cada medida como un porcentaje del promedio) el asterisco señala un desplazamiento estadísticamente diferente al que se obtuvo con el resto de las drogas (prueba t de Student, $p < 0.05$)

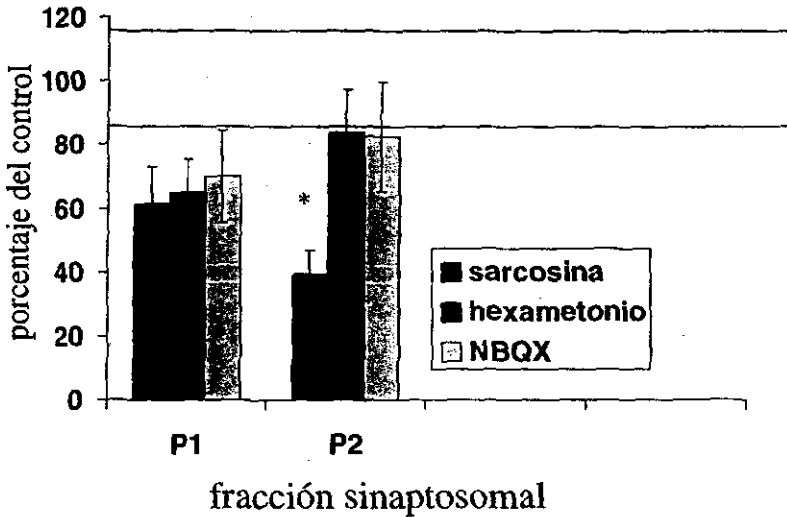


Figura 5.- Unión de glicina-³H en presencia de diferentes drogas probadas como desplazadores, las líneas horizontales marcan el intervalo de variabilidad en estos experimentos (\pm 17%, se expresó el error estándar de cada medida como un porcentaje del promedio) el asterisco señala un desplazamiento estadísticamente diferente al que se obtuvo con el resto de las drogas (prueba t de Student, $p < 0.05$)

Inmunotransferencia

En la figura 6 se muestra la inmunotransferencia correspondiente al mAb 7a. En esta figura se aprecia que las membranas sinaptosomales de la médula espinal de la rata y de la retina de la rana muestran el mismo patrón de reactividad: hay una banda de 93 kDa correspondiente a la gefirina, además de una banda de aproximadamente 141 kDa. Este patrón se repitió todas las veces que se realizó el experimento (3 preparaciones diferentes), pese a combinar diversos periodos de ebullición de las muestras antes de separar por electroforesis. Como el mAb 7a reconoce exclusivamente a la gefirina, la banda de alto peso molecular probablemente corresponde a la suma de la gefirina más la subunidad α del RGly (48 kDa).

La figura 7 corresponde a las inmunotransferencias con el mAb 4a, probado en las membranas de P1 y P2 de la retina de la rana, el patrón obtenido se repitió en 3 ensayos diferentes. Se encontró una banda de 48 kDa, así como otras dos bandas de mayor peso molecular, en el intervalo de 70 kDa y de 96 kDa. Esta tercera banda corresponde al dímero de subunidades α , que permanece aun bajo las condiciones reductoras del gel, la banda de mediano peso molecular no corresponde a ninguna proteína conocida, aunque Miller y Schnellman (1994) han encontrado que el mAb 4a reconoce a una banda de 75 kDa en las membranas del túbulo renal del conejo.

Lo más relevante de este experimento es que no detectamos una banda de masa molecular equivalente a la subunidad β (58 kDa), lo que implica que en las fracciones sinaptosomales de la retina de la rana se encuentran sólo las subunidades α del RGly. Puede argüirse también que las fracciones sinaptosomales, al no incluir a todo el tejido, pierdan las subunidades β ; sin embargo, es poco probable que se pierda selectivamente sólo un tipo de subunidad durante el proceso de aislamiento. De forma análoga a lo que se expuso en párrafos anteriores, que en los túbulos renales del conejo se detecta la subunidad β y no la α , es plausible que los sinaptosomas de la retina de la rana incluyan únicamente a la subunidad α del RGly, ó que en la retina de la rana exista una isoforma de la subunidad β a la que no reconoce el mAb 4a; con los datos disponibles, no puede discernirse entre una y otra alternativa.

Es probable que el RGly de la retina de la rana se componga de homoligómeros de subunidades α , la existencia de homoligómeros de esta naturaleza es plausible, conforme se expuso en la Introducción (Pérez-León y Salceda, 1996 El receptor postsináptico de glicina), aun cuando no puede descartarse que en la retina de la rana exista una subunidad β distinta a las hasta ahora conocidas.

El Ab 384 (fig. 8) y el Ab RGly (fig. 9) reconocen a una sola banda de 48 kDa, tanto en membranas sinaptosomales de la médula espinal de la rata como de la retina de la rana. Estos anticuerpos se probaron por Ruíz-Gómez y colaboradores (1991), con resultados semejantes.

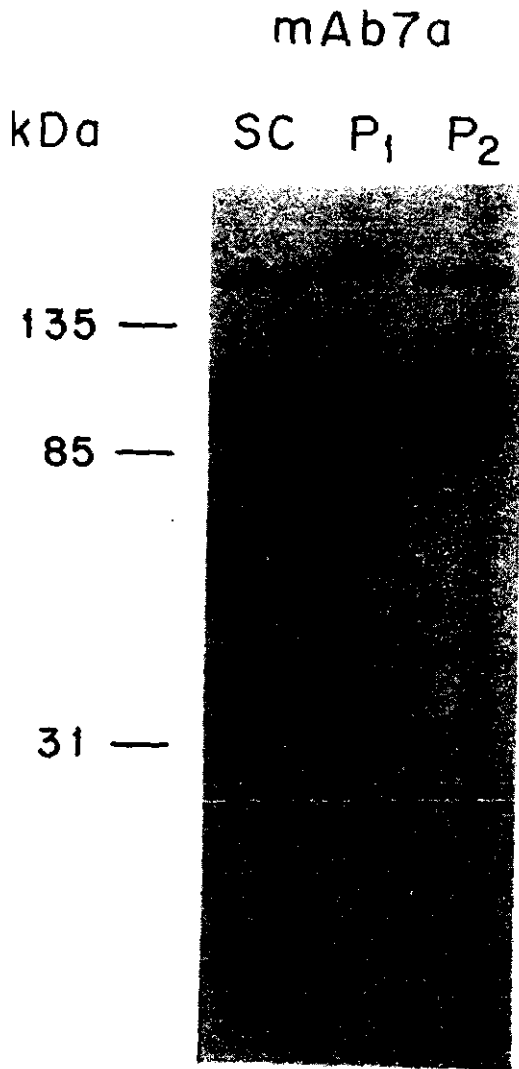


Figura 6.- Inmunotransferencia de las membranas sinaptosomales de la médula espinal de la rata (SC) y de las fracciones sinaptosomales de la retina de la rana con el mAb 7a, utilizando DAB como cromógeno. En todos los carriles se marcó una banda de 93 kDa correspondiente a la gefirina y una banda adicional que se discute en el texto.

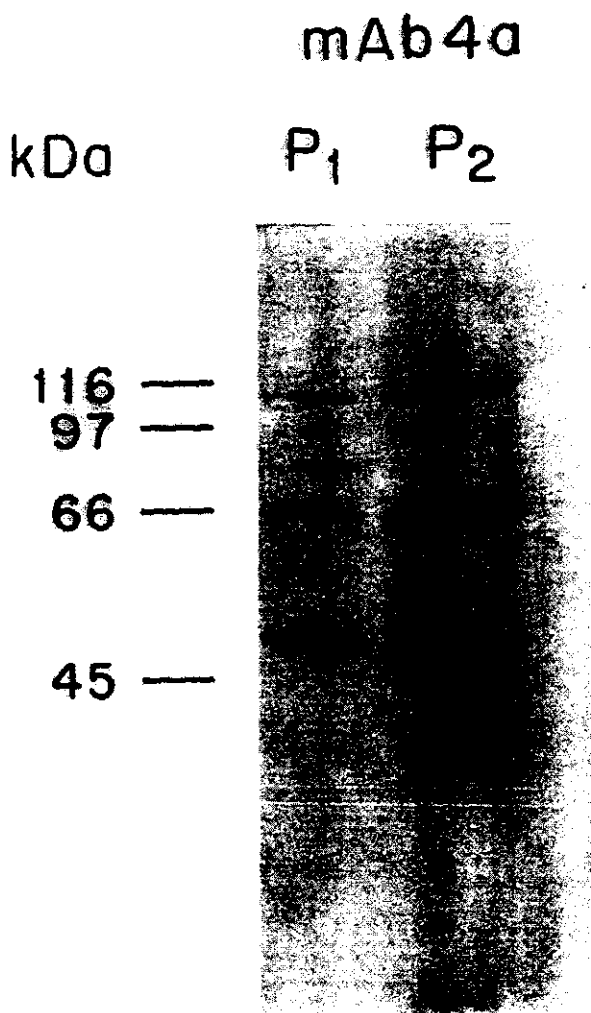


Figura 7.- Inmunotransferencia de las membranas sinaptosomales de la retina de la rana con el maAb 4a utilizando DAB como cromógeno. Se marcaron 2 bandas de masas relativas de 48 kDa y 96 kDa, la primera correspondiente a la subunidad α y la segunda al dímero de ésta. Se reveló también una banda en el intervalo de 70 kDa, que se discute en el texto.

Ab 384

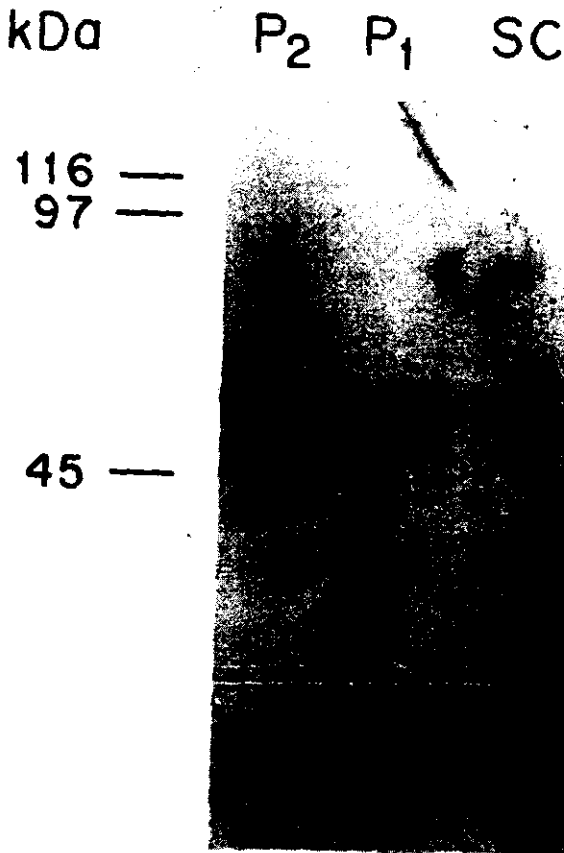


Figura 8.- Inmunotransferencia de las membranas sinaptosomales de la retina de la rana y de la médula espinal de la rata (SC) con el anticuerpo policlonal Ab 384, la localización del anticuerpo se reveló con IgG acoplada a fosfatasa alcalina. En todas las muestras se marcó una banda de 48 kDa.

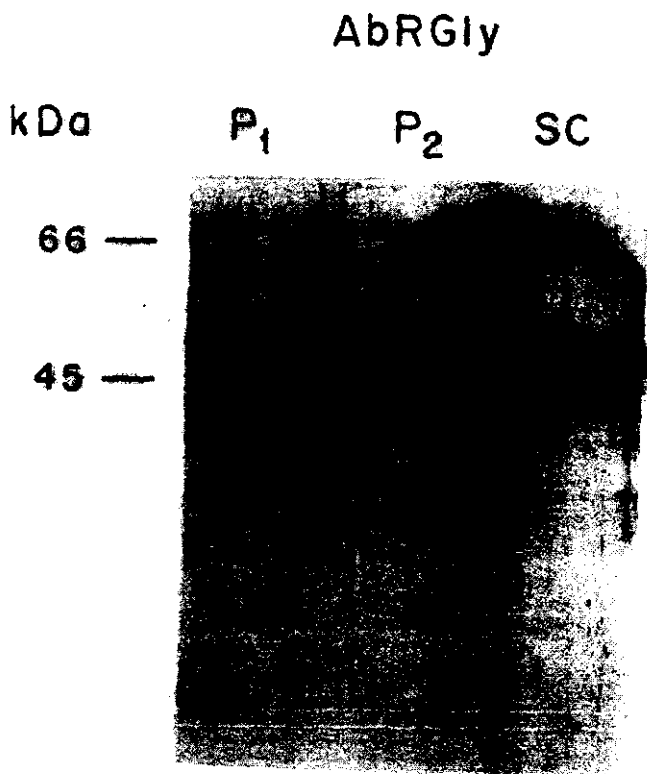


Figura 9.- Inmunotransferencia de las membranas sinaptosomales de la retina de la rana, P₁ y P₂ y de la médula espinal (SC) de la rata probadas con el anticuerpo policlonal Ab RGly (cromógeno DAB). La banda que se aprecia en cada uno de los carriles tuvo una masa molecular calculada en 48 kDa.

Inmunohistoquímica

En la figura 10 se muestran los cortes de retina de rana sometidos a inmunohistoquímica con el mAb 7a. Puede apreciarse que la inmunorreactividad se localiza en la CPI, así nuestros resultados son semejantes a los obtenidos con el uso de el mAb 7a en las retinas del conejo, la rata, el mono y el gato (Grünert y Wässle, 1993) y, en particular, a los que se han obtenido en la rana *Xenopus laevis* (Smiley y Yazulla, 1990b), si bien en las especies de mamíferos la gefirina se localizó también sobre algunas células ganglionares (Grünert & Wässle, 1993).

Figura 10 (página siguiente).- Inmunohistoquímica contra la proteína de 93 kDa del RGly, la localización del anticuerpo se detectó con el método de biotina-avidina-peroxidasa, el producto de reacción se localiza sobre la capa plexiforme interna (CPI), indicando la presencia de la gefirina en esta zona de la retina. Abreviaturas ROS: segmentos externos de los fotorreceptores; CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares.

control



20 μ m

mAb 7a



Inmunohistoquímica con los anticuerpos mAb 4a, AbRGly y Ab 384 .- Los resultados obtenidos con los anticuerpos mAb 4a, Ab RGly y Ab 384, se incluyen en el manuscrito *Immunohistochemical localization of glycine receptor in synaptic layers and glial cells of frog retina*, aceptado para su publicación en la revista Primary Sensory Neuron, se describen a continuación.

La inmunohistoquímica con el mAb 4a, que reconoce a las subunidades $\alpha 1$ - $\alpha 4$ y β del RGly, produjo reacción en la capa plexiforme interna (CPI), tanto en la rana (fig 1B del manuscrito referido) como en la rata (fig 2B). Dado que las fracciones sinaptosomales de la retina de la rana evaluadas con el mAb 4a no mostraron la banda correspondiente a la subunidad β (sección anterior), concluimos que el patrón observado en la inmunohistoquímica corresponde únicamente a la distribución de la subunidad α .

En la retina de la rana la inmunorreactividad fue homogénea sobre toda la extensión de la CPI. ello indica que las neuronas en donde se encuentran las subunidades α del RGly, se estratifican de manera dispersa.

En la retina de la rata pudieron distinguirse dos bandas con mayor intensidad al centro de la CPI. Este último dato es semejante al obtenido por Grünert y Wässle (1993), e indica que en esa zona de la CPI hay una densidad mayor de las subunidades del RGly, a forma de corolario, el hecho de que repitamos el patrón de inmunorreactividad obtenido por otros investigadores al utilizar el mismo anticuerpo (el mAb 4a) en el mismo tejido (la retina de la rata), evalúa satisfactoriamente los resultados obtenidos en la retina de la rana

Las figuras 1C y 2C del manuscrito citado muestran, respectivamente, la inmunorreactividad producida con el Ab RGly en la retina de la rana y de la rata. Hubo una señal positiva muy fuerte en la capa plexiforme externa (CPE), en la CPI y, además de estas capas plexiformes, en algunos procesos provenientes de la capa de células ganglionares, que se señalan con flechas en las figuras. Estos procesos cruzaron en sentido vertical a la retina, terminando en la CPE, lo que concuerda con las prolongaciones descritas en las células de Müller, el tipo principal de célula glial en la retina (Semple-Rowland, 1991). Los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica del Ab 384 fueron semejantes y se muestran en las figuras 1D y 2D del manuscrito citado al inicio de esta sección.

El uso de estos anticuerpos policlonales demostró que hay alguna isoforma de la subunidad α que se localiza en la CPE de la rata, con lo que se extiende la participación probable de la glicina en la

comunicación neuronal en esta capa de la retina de los mamíferos. Además, y de forma más relevante, los anticuerpos policlonales detectaron a esta isoforma en procesos que parecen ser de células gliales.

Para determinar si los procesos marcados por los anticuerpos Ab RGly y Ab 384 corresponden a células de Müller, realizamos experimentos de marcaje doble con un coctel que incluyó a uno de esos anticuerpos además de un mAb dirigido vs la sintetasa de glutamina (Chemicon). La figura 3 muestra el resultado correspondiente a la combinación Ab RGly/sintetasa de glutamina en las retinas de la rana (3C, 3D) y de la rata (3G, 3H, obtuvimos datos iguales con el coctel Ab 384/sintetasa de glutamina que no mostramos). El patrón obtenido muestra una co-localización exacta del AbRGly y el mAb vs sintetasa de glutamina, apoyando la idea de que los anticuerpos policlonales AbRGly y Ab 384 detectan la presencia del RGly sobre las células gliales de Müller en la retina.

Queda por explicar que la co-localización es tan precisa, que la distinción entre una y otra figura no es clara, creemos que los procesos de las células de Müller están marcados y que la inmunorreactividad al RGly co-localizó con éstos, pero coinciden de forma tal que las figuras parecen ser las mismas. No obstante, la especificidad de los anticuerpos secundarios se demuestra en los cortes control, probados sin anticuerpos primarios y un coctel de IgG's conjugadas a Cy3 y FITC (figuras 3B y 3F del manuscrito inserto), en los que la fluorescencia basal es muy débil. Como una corroboración adicional a la idea del marcaje de células de Müller por los anticuerpos Ab RGly y Ab 384, intentamos la inmunocitoquímica con tales anticuerpos en células de Müller aisladas.

FIRST PROOFS

AUTHOR PROOFS

Prim. Sensory Neuron, Vol. 0, No. 0, pp. 1-11 (1998)
© VSP 1998.

Immunohistochemical localization of the glycine receptor in synaptic layers and glial cells of the retina

JORGE ALBERTO PÉREZ-LEÓN and ROCÍO SALCEDA *

Departamento de Neurociencias, Apdo. Postal 70-253, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510 México, DF

Abstract—Glycine has been considered as a neurotransmitter in the inner plexiform layer (IPL) of mammalian retina. In cold-blooded vertebrates both the outer and the inner plexiform layer appear to use glycine as a neurotransmitter. In this work we used monoclonal and polyclonal antibodies to study the localization of the postsynaptic glycine receptor (GlyR) subunits in frog and rat retina. Monoclonal antibodies revealed the presence of GlyR α and β subunits at the inner plexiform layer, whereas immunoreactivity to the polyclonal antibodies was observed, besides the IPL, in the outer plexiform layer and on Müller glial cells. These findings suggest that some isoforms of GlyR are localized in synaptic terminals and glial cells within vertebrate retina.

Keywords: Glycine; receptor; retina; immunohistochemistry; Müller cell; synaptic layers; frog; rat.

1. INTRODUCTION

Glycine has been shown to play an important role as an inhibitory neurotransmitter in the vertebrate retina. Several groups have reported high concentrations of this amino acid within vertebrate retinas (Voaden, 1976; Marc, 1989) and autoradiographic studies have shown glycine transport by retinal neurons (Pourcho and Goebel, 1990). In mammals, glycine actions appear to be restricted to the inner retina, acting on ganglion, amacrine and bipolar cells (Stone and Pinto, 1992, 1993; Boos *et al.*, 1993). In amphibian retina glycine appears to act at both the outer and in the inner plexiform layers, since it depolarizes horizontal neurons (Stockton and Slaughter, 1991), hyperpolarizes the ganglion cells (Pan and Slaughter, 1993; Yang and Wu, 1993), and biochemical studies have localized glycine and strychnine binding sites in synaptosomal fractions isolated from the outer and the inner plexiform layers of frog retina (Pérez-León and Salceda, 1995). These actions of glycine in

*To whom correspondence should be addressed.

Introduction

Glycine has been shown to play an important role as inhibitory neurotransmitter in the vertebrate retina. Several groups have reported high concentrations of this amino acid within vertebrate retinas (Marc, 1989; Voaden, 1976) and autoradiographic studies have shown glycine transport by retinal neurons (Pourcho and Goebel, 1990). In mammals, glycine actions appear to be restricted to the inner retina, acting on ganglion, amacrine and bipolar cells (Boos *et al.*, 1993; Stone and Pinto, 1992, 1993). In amphibian retina glycine appears to act at both the outer and in the inner plexiform layers, since it depolarizes horizontal neurons (Stockton and Slaughter, 1991) hyperpolarizes the ganglion cells (Yang and Wu, 1993; Pan and Slaughter, 1993), and biochemical studies have localized glycine and strychnine binding sites in synaptosomal fractions isolated from the outer and the inner plexiform layers of frog retina (Pérez-León and Salceda, 1995). These actions of glycine in retina are mediated through the strychnine-sensitive postsynaptic glycine receptor (GlyR).

The GlyR has been proposed to have a pentameric structure, composed of three 48 kDa- α subunits, and two 58 kDa β subunits (Langosch *et al.*, 1990). These subunits form the chloride channel gated by glycine (Langosch *et al.*, 1990). The pentameric GlyR is associated to a peripheral intracytoplasmic protein named gephyrin, which it is supposed to be a GlyR-tubulin linker protein (Kirsch and Betz, 1995; Kirsch *et al.*, 1991). Different isoforms of α and β subunits have been reported by cloning studies and heterologous expression has demonstrated that the subunits form receptors with different sensitivities to the antagonist strychnine and chloride channel blockers.

The α and β subunits of the GlyR have been localized by immunohistochemistry using monoclonal antibodies at the inner plexiform layer (IPL) of mammalian retina (Grünert and Wässle, 1993), whereas gephyrin has been immunolocalized in the IPL in mammals (Jager and Wässle, 1987), and in both the IPL and the outer plexiform layer (OPL) of cold-blooded vertebrates (Smiley and Yazulla, 1990; Yang and Wu, 1993; Yazulla and Studholme, 1991). However, it has been recently shown in mammalian retina that gephyrin colocalizes with several subunits of gamma-amino-butyric acid (GABA) type A receptor (Sassoè-Pognetto *et al.*, 1995). Therefore, the gephyrin immunolocalization can not be longer used as an unequivocal criterion for signaling glycinergic synapses.

In this work we used monoclonal and polyclonal antibodies raised against the α and β subunits of the GlyR to study their localization in the frog and rat retina.

Methods

Animals.- Frogs (*Rana pipiens*) and pigmented rats (Long Evans) were used in these experiments. Animals were dark-adapted, decapitated and enucleated under dim red light conditions. Eyeballs

were immediately immersed in 4% paraformaldehyde-0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 during 30 min. Eyeballs were then hemisected and optic cups were fixed for two hours in the same fixative. We performed a series of experiments in which we used shorter fixation times and results were essentially the same, though the sensitivity of mAb 4a to aldehyde fixation, as reported by Grünert and Wässle (1993). Tissue was washed in 0.9% NaCl-PB (PBS) and cryoprotected in successive concentrations of sucrose (10%, 20% and 30% sucrose-PB, 30 min each) and finally in 30% sucrose-PB overnight at 4°C.

Retinas from rat and frog were positioned in a single block and 10 µm thick vertical sections were cut with a cryostat, collected onto gelatin-coated slides and stored at -20°C until experiments were done.

Antibodies. The monoclonal antibody mAb 4a, raised using purified rat GlyR, recognizes all the GlyR α subunit isoforms known to date as well as the β subunit (Pfeiffer *et al.*, 1984). The rabbit polyclonal antibody AbRGly was also raised against the purified rat spinal cord GlyR (Ruiz-Gómez, *et al.*, 1991). A synthetic sequence corresponding to amino acids 384 through 391 of the α subunit was used to produce the polyclonal antibody Ab384 (Ruiz-Gómez *et al.*, 1991). In western blot assays both polyclonal antibodies recognize a 48 kDa band in synaptosomal membranes isolated from rat spinal cord (Ruiz-Gómez *et al.*, 1991) and plexiform layers of frog retina (Pérez-León, not published). A monoclonal antibody against the glial enzyme glutamine synthetase (Chemicon, USA) was used in double-label immunofluorescence experiments.

Immunohistochemistry. In all experiments alternate retinal sections were used to test the different antibodies. Acetone was used to permeabilize sections (10 min at -20°C), the slides were then air-dried at room temperature and hydrated in 0.131 M NaCl-5 mM Tris-HCl, pH 7.6 containing 0.1% Triton X-100 (TBS). Sections were incubated in a blocking solution containing normal goat serum 20% -TBS during 30 minutes and then with the primary antibodies overnight at 4°C. After two 10 min wash in TBS, sections were incubated two hours at room temperature with secondary antibodies coupled to alkaline phosphatase goat anti-mouse (Sigma) or goat anti-rabbit (Boehringer). The primary and secondary antibodies were diluted 1:100 in TBS. The alkaline phosphatase activity was visualized using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP, Boehringer) as substrate and nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) as chromogen in a MgCl₂ 50 mM- Tris-NaCl 100 mM solution adjusted to pH 9.5 with HCl. Levamisole (Sigma) was used as an inhibitor of endogenous phosphatases. Then slides were coverslipped using glycerol.

For double label experiments the sections were incubated with the monoclonal antibody against glutamine synthetase (Chemicon, 1:500) and either the AbRGly or the Ab384. Goat antimouse

ciano-methyl-indocyanine (Cy3, Zymed) and goat anti-rabbit fluorescein-isothiocyanate (FITC, Sigma) conjugate immunoglobulins, diluted 1:50 and 1:200 respectively, were used as secondary antibodies.

All secondary antibodies were pre-absorbed with rat serum, as stated by commercial providers.

Sections incubated in 20% normal goat serum instead primary antibodies and exposed to all subsequent treatments were used as controls.

Results

Immunohistochemistry with the monoclonal antibody mAb 4a revealed the presence of the α and β subunits of the GlyR at the inner plexiform layer (IPL) in frog (figure 1B) as well as in the rat retina (figure 2B). In frog retina a homogeneous immunoreactivity covered the entire IPL, whereas in rat retina two strongly-reactive bands were noticed at the IPL over a diffuse labeling of the rest of this layer.

Figures 1C and 2C show the immunoreactivity obtained with the AbRGly in frog and rat retinas, respectively. Strong positive immunoreactivity to AbRGly was observed at both IPL and outer plexiform layer (OPL). Besides plexiform layers, some processes originated at the ganglion cell layer were labeled (arrows in figures 1C and 2C). These processes extended through the inner span of the inner nuclear layer (INL) and reached the OPL, matching the features characteristic of glial Müller cells (MC) (Semple-Rowland, 1991). Similar results were obtained with Ab384 (figures 1D and 2D).

In order to determine whether the processes marked by AbRGly and Ab384 correspond indeed to MC, we performed double labeling immunofluorescence experiments. As shown in figure 3, AbRGly immunofluorescence colocalized with that from glutamine synthetase, a marker enzyme for glial cells (Semple-Rowland, 1991). Immunofluorescence obtained for frog (fig 3C, D) and rat retinas (fig 3G, H) supports the notion that the polyclonal antibodies against α subunit of GlyR labeled glial cells in these tissues. Similar immunofluorescence results were obtained with Ab 384 (not shown).

Discussion

There is a considerable evidence suggesting that glycine is a neurotransmitter within the IPL of the mammalian retina (Marc, 1989). On the other hand, this role for glycine in the OPL and also in

the IPL of the amphibian retina is less clear, although it has been suggested by several authors (Pérez-León and Salceda, 1995; Stockton and Slaughter, 1991; Voaden, 1976).

Our observation of labeling with mAb 4a at IPL in rat retina is in agreement with results previously reported (Grünert and Wässle, 1993). There are no previous reports on this labeling in frog retina, where we found a strong immunoreactivity to mAb 4a covering also the IPL, indicating that the distribution of the GlyR subunits recognized by this antibody is the same within amphibian and mammalian retina.

The polyclonal antibodies AbRGly and Ab384 were also immunoreactive at the IPL in retinal sections from both species. This result matches the labeling obtained with mAb 4a, described above, suggesting that immunoreactivity obtained with polyclonal antibodies at the IPL corresponds to GlyR α and β subunits. However, the polyclonal antibodies AbRGly and Ab384 also labeled the OPL, suggesting that GlyR mediated transmission occurs in this layer. Although the polyclonal antibodies we used have not been tested before for immunohistochemistry, biochemical studies indicated that they only react against the α subunit of GlyR isolated from rat spinal cord (Ruiz-Gómez *et al*, 1991) and synaptosomal membranes from frog retina (not shown). Since Ab384 was raised against a sequence consisting of eight amino acids from the α subunit, and showed the same labeling pattern of that from the AbRGly, it can be safely concluded that the polyclonal antibodies recognize the same epitope. This epitope is not recognized by the monoclonal antibody 4a. This apparent discrepancy might be explained by the presence in retina of a yet no described α subunit, as suggested by the different immunoreactivities obtained in mammalian retina with the monoclonal antibodies 4a and 2b, the second one recognizing exclusively the $\alpha 1$ subunit (Grünert and Wässle, 1993).

These findings are in agreement, with the strychnine-sensitive glycine-evoked responses of *Amblystoma tigrinum* horizontal cells (Borges and Wilson, 1991; Yang and Wu, 1993) and also with the specific high affinity [3 H]-strychnine and [3 H]- glycine binding in synaptosomes isolated from the OPL (Pérez-León and Salceda, 1995). These data together, point to the conclusion that glycinergic transmission occurs in both outer and inner plexiform layers of vertebrate retina.

Interestingly, besides the plexiform layers, AbRGly and Ab384 labeled some somata at the inner nuclear layer. These somata extended processes along the retina from the inner limiting membrane to the outer limiting membrane, and this labeling colocalized with the immunoreactivity to the monoclonal antibody against glutamine synthetase, a marker enzyme of glial cells. It has been recently shown that spinal cord macroglia has strychnine sensitive glycine-activated chloride currents (Pastor *et al*, 1995). Studies performed with reverse transcriptase-polymerase chain

reaction in isolated medullar glial cells have demonstrated the expression of $\alpha 1$ and β subunits of the GlyR. These subunits were expressed by different population of cells (Kirchoff *et al*, 1996). These data, altogether with our findings, point out to the existence of restricted GlyR isoforms in glial cells. Although the role of these receptors remains to be studied a possible function could be the control of concentration of potassium during the light-induced depolarization of Müller cells (Karwoski and Proenza, 1977).

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the kind gift of the monoclonal antibody 4a to Dr. H. Betz (Frankfurt, Germany) and the polyclonal antibodies AbRGly and Ab384 to Dr. F. Mayor (Madrid, Spain). We also thank Mr. Gustavo Sánchez-Chávez and Mr. Federico Jandete-García for technical assistance. We also thank to Dr. Ricardo Tapia for the critical reading of manuscript. J.A.P.L. had a Fellowship from PADEP and DGAPA -UNAM.

REFERENCES

- 1.- Boos R, Schneider H and Wässle H. (1993) Voltage- and transmitter-gated currents of All amacrine cells in a slice preparation of the rat retina *J. Neurosci.*, 13:2874-2888.
- 2.- Borges S and Wilson M. (1991) Dual effect of glycine on horizontal cells of the tiger salamander retina. *J Neurophysiol.*, 66:1993-2001.
- 3.- Grünert U. and Wässle H. (1993) Immunohistochemical localization of glycine receptors in the mammal retina. *J Comp Neurol*, 335:523-537.
- 4.- Jager J and Wässle H. (1987) Localization of glycine uptake and receptors in the cat retina. *Neurosci Let*, 75:147-151.
- 5.- Karwoski CJ and Proenza LM (1977) Relationship between Müller cell responses, a local transretinal potential and potassium flux. *J Neurophysiol.* 40:244-259.
- 6.- Kirchhoff F, Mülhardt C, Pastor A., Becker C-M. & Kettenmann H. (1996) Expression of glycine receptor subunits in the glial cells of the rat spinal cord. *J Neurochem*, 66:1383-1390.
- 7.- Kirsch J and Betz, H. (1995) The postsynaptic localization of the GlyR associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci*, 15:4148-4156.
8. Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B. and Betz H (1991) The 93 kDa GlyR associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem*, 266:22242-22245.
- 9.- Langosch, D.; Betz, H. & C-M. Becker (1990) In: *Glycine Neurotransmission* (Eds Ottersen, O.P. & Storm-Mathisen) pp 67-82 . John Wiley & Sons Ltd. England.
- 10.- Marc RE. The role of Glycine in mammalian retina. (1989) *Progress in retinal Research*, 8:119-158.
- 11.- Pan ZH and Slaughter MM. (1993) Comparison of the actions of glycine and related aminoacids on isolated third order neurons from the tiger salamander retina. *Neuroscience*, 64:153-164.
- 12.- Pastor A, Chvátal A, Sykova E, Kettenmann H. (1995) Glycine and γ -amino-butyric acid activated currents in identified cells of the developing rat spinal cord slice. *Eur. J. Neurosci.* 7:1188-1198.
- 13.- Pérez-León JA and Salceda R. (1995) Different specific binding sites of ^3H -glycine and ^3H -strychnine in synaptosomal membranes isolated from frog retina. *Neurochem. Res.*, 20: 915-922.

- 14.- Pfeiffer F, Simler R, Greningloh G and Betz H. (1984) Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of the rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7224-7227.
- 15.- Pourcho, R. G. and D. J. Goebel (1990) Autoradiographic and Immunocytochemical studies of glycine-containing neurons in retina. In: *Glycine Neurotransmission*. (Eds Ottersen, O. P. & Storm-Mathisen, J.) pp: 355-391. John Wiley & Sons Ltd. England.
- 16.- Ruiz-Gomez A , Vaello ML Valdivieso F and Mayor Jr F. (1991) Phosphorylation of the 48 kDa of the GlyR by protein kinase-C. *J. Biol. Chem.*, 266:559-566.
- 17.- Sassoè-Pognetto M, Kirsch J, Grünert U, Greferath U, Fritsch JM, Möhler H, Betz H and Wässle H. (1995). Co-localization of gephyrin and GABA_A receptors subunits in the rat retina. *J Comp. Neurol*, 357:1-14.
- 18.- Semple-Rowland SL. (1991) Expression of glial fibrillary acidic protein by Müller cells in *rd* chick retina. *J. Comp Neurol.*, 305:582-590.
- 19.- Smiley JF and Yazulla S. (1990) Glycinergic contacts in the outer plexiform layer of the *Xenopus laevis* retina characterized by antibodies to glycine, GABA and glycine receptors. *J Comp Neurol*, 299:375-388.
- 20.- Stockton RA and Slaughter MM. (1991) Depolarizing actions of GABA and glycine on amphibian horizontal cell. *J. Neurophysiol.*, 65:680-692.
- 21.- Stone C and Pinto L. (1992) Receptive field organization of retinal ganglion cells in the spastic mutant mouse. *J P hysiol.*, 956:125-142.
- 22.- Stone C and Pinto L. (1993) Response properties of ganglion cells in the isolated mouse retina. *Visual Neurosci* 10:31-39.
- 23.- Voaden MJ. (1976) Gamma aminobutyric acid and glycine as retinal transmitters. In: *Transmitters in the visual process*. (Ed. Bonting, SL.) Oxford, University Press. pp.107-126, Great Britain.
- 24.- Yang X-L and Wu S. (1993). Effects of GABA on the horizontal cells in the tiger salamander retina. *Vision Res.*, 33:1339-1344.
- 25.- Yazulla S and Studholme KM. (1991). Glycine receptor immunoreactivity in retinal bipolar cells is postsynaptic to glycinergic and GABAergic amacrine cells synapses. *J Comp. Neurol.*, 310: 11-20.

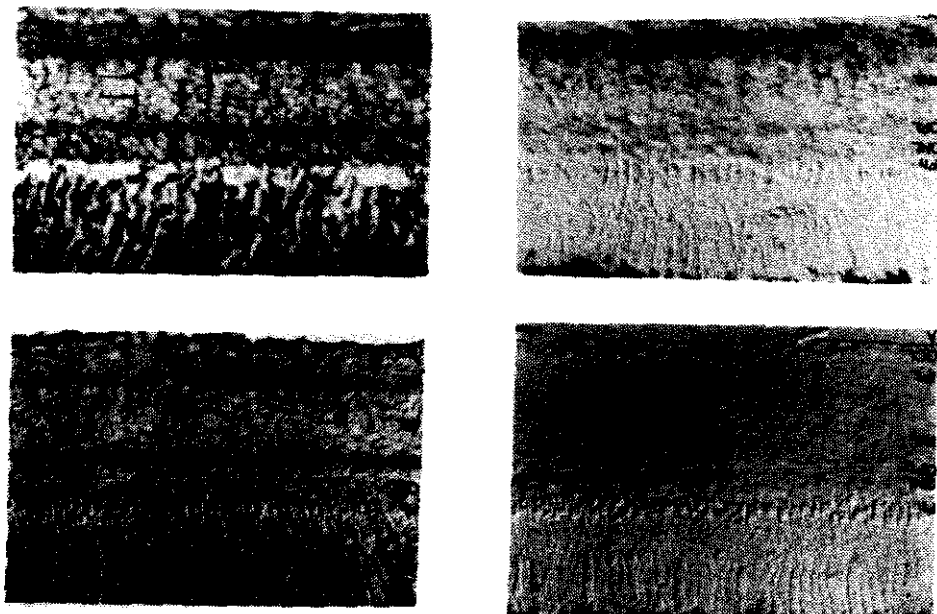


Figure 1.- Vertical sections through frog retina processed with no primary antibody (control, A) mAb 4a (B), AbRGly (C) or Ab 384 (D). B) Immunoreactivity to mAb 4a is restricted to IPL. C) Immunoreactivity to AbRGly covers IPL and extends to OPL. Strongly labeled processes can also be seen through the IPL and reaching the OPL (arrows). These processes are clearly originating at the ganglion cell layer, and probably correspond to glial Müller cells. D) Immunoreactivity obtained with Ab384 parallels that of AbRGly: IPL, OPL and MC-like processes were labeled. Some no specific labeling appeared on photoreceptor outer segments (C and D). Abbreviations: Ph: photoreceptor layer, ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GCL: ganglion cell layer. Calibration bar = 20 μ m. These results were consistently repeated in eighteen retinas.

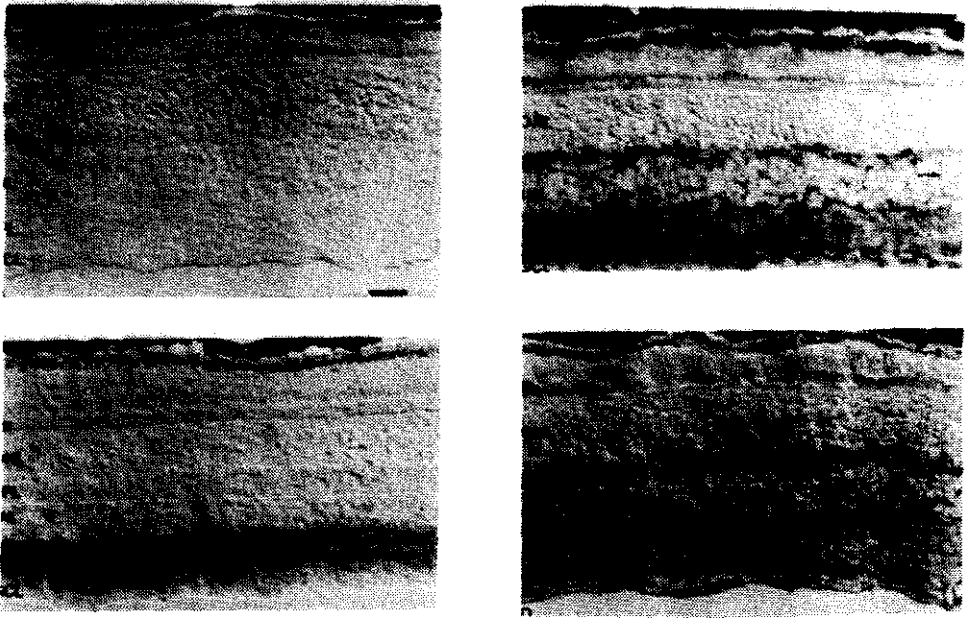


Figure 2.- Micrographs of vertical cryostat sections through rat retina processed with no primary antibody (control, A), mAb 4a (B) or polyclonal Ab's AbRGly (C) and Ab384 (D). B) Two bands of intense labeling with mAb 4a are distinguished at inner plexiform layer (IPL). C) Strong immunoreactivity to Ab RGly is localized at IPL, there is also weak although significant labeling at outer plexiform layer (OPL). Arrows mark some processes surrounding cell bodies at inner nuclear (INL) and ganglion cell layer, these processes could be MÖller glial cells (MC, see text). D) Immunoreactivity obtained with Ab384 also was over IPL, OPL and MC-like processes. Abbreviations as in figure 1, scale bar = 20 μ m. Experiments were repeated in a total amount of eighteen retinas

Figure 3.- Vertical sections through frog (A-D) and rat retina (E-H) processed for double-label immunofluorescence with monoclonal antibody against glutamine synthetase (C, G) and AbRGly (D, H). Immunofluorescence with the two antibodies perfectly matched: the same cells are labeled. Nomarsky optics (A, E) shows retinal layers, control sections (B, F) show no immunoreactivity. Abbreviations as in figure 1, scale bar equals 20 μ m. Experiments were done 3 times.



Inmunocitoquímica de células de Müller aisladas de la retina de la rana

La morfología de las células de Müller aisladas de la retina de la rana (figura 11) corresponde con la reportada para otras especies, tanto de mamíferos (Rauen et al, 1996) como de aves y anfibios (Semple-Rowland, 1991; Keirstead y Müller, 1995). La incubación con el anticuerpo monoclonal vs la vimentina (SIGMA), una proteína marcadora de las células gliales, produjo una reacción positiva en estas células, reforzando su identificación como células gliales de Müller (figura 13).

Estas células reaccionaron positivamente a la incubación con los anticuerpos Ab 384 y AbRGly, produciendo una marca que se extendió a todo el soma, incluyendo las prolongaciones (figuras 11 y 12). De esta manera, se confirmó que las prolongaciones señaladas en las secciones verticales de la retina correspondieron a las células de Müller.

En las células aisladas el mAb 4a no produjo reacción. Combinando estos datos con los de la inmunohistoquímica en cortes verticales, se deduce que la isoforma del RGly que se encuentra en las células de Müller no se compone de alguna de las subunidades α conocidas.

Figura 11 (página siguiente, p nel superior).- Inmunoquímica con el Ab 384 en células de Müller aisladas de la retina de la rana. El lote control se trató con suero normal, la presencia del anticuerpo Ab384 se reveló con IgG's acopladas a fosfatasa alcalina.

Figura 12 (página siguiente, p nel inferior).- Inmunofluorescencia con el anticuerpo AbRGly en células de Müller aisladas de la retina de la rana, el lote control se trató con suero normal y la presencia del AbRGly se detectó con IgG's conjugadas con FITC. La señal brillante corresponde a este fluoróforo

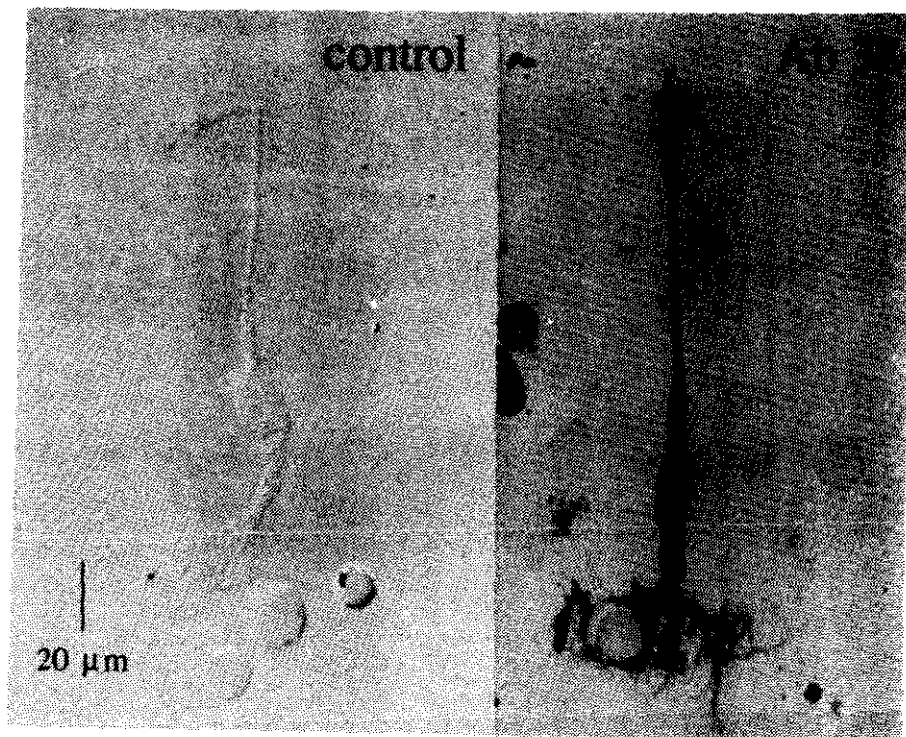
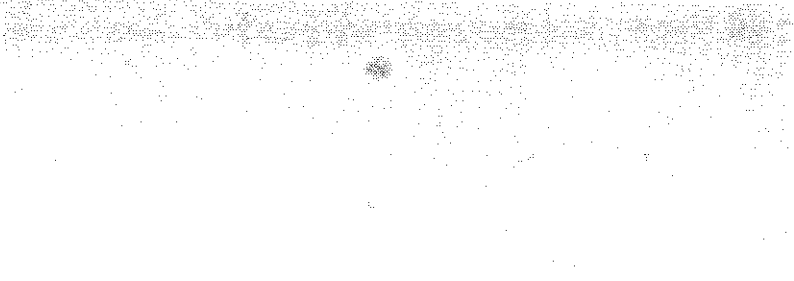


Figura 13 (página siguiente).- Células de Müller aisladas de la retina de la rana. El panel superior muestra una imagen de iluminación de contraste de fases, el panel inferior es una imagen de microscopía de fluorescencia. Las células se trataron con un mAb contra vimentina, el anticuerpo primario se detectó con IgG's conjugadas a FITC



10 μm



DISCUSION GENERAL

En la inmunotransferencia realizada con el mAb 4a se detectó sólo la banda correspondiente a la subunidad α del RGly (Resultados, inmunotransferencia, figura 7). Este dato puede deberse a la carencia de subunidades β ó a la existencia de isoformas de ésta a las cuales no pueda reconocer el mAb 4a, como se mencionó en la sección de Resultados, los datos presentes no permiten distinguir entre tales alternativas. El mAb 4a se une a la secuencia de aminoácidos 96-105 de la subunidad α (Schröder et al, 1991), de localización extracelular y que es idéntica en todas las isoformas α y en la subunidad β . Si en la retina de la rana existe una isoforma de la subunidad β , ésta difiere en la secuencia de aminoácidos mencionada, la existencia de tal subunidad β en la retina de la rana provocaría el ensamblamiento de heterolímeros α/β bastante diferentes a los que se han caracterizado a la fecha, así que, sea que la retina de la rana carece de subunidades β , ó que éstas son tan diferentes que no se reconocen por el mAb 4a, el resultado sobre el RGly en la retina de la rana es el mismo: este receptor postsináptico es atípico con respecto al modelo resultante de la médula espinal de los mamíferos. El resto de los resultados se discuten considerando este hecho.

Unión de ligandos radioactivos

La estriquina- ^3H ha sido el único ligando radioactivo utilizado para caracterizar al RGly mediante experimentos de unión específica. Hasta el descubrimiento del sitio de glicina insensible a estriquina dentro del NMDA_R (Johnson and Ascher, 1987), eran raros los estudios de unión específica de glicina- ^3H (p.ej. Kishimoto *et al*, 1981), esta restricción oscureció durante mucho tiempo el conocimiento de la actividad que la glicina pudiera tener sobre otros sistemas de neurotransmisión, e incluso sobre algunas isoformas del RGly insensibles a la estriquina (Kuhse *et al*, 1990). Nosotros encontramos que, en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana, existen diferencias entre la unión específica de glicina- ^3H y estriquina- ^3H (Pérez-León y Salceda, 1995, ver anexo, antecedentes, Introducción), no sólo en afinidad, lo que podría explicarse por que una molécula es el agonista y la otra el antagonista del mismo receptor, si no incluso en sensibilidad farmacológica, la que debería ser la misma si ambos ligandos se unieran sobre el mismo complejo proteínico (Young y Snyder, 1973 y 1974), sugerimos entonces que estos ligandos pueden señalar la existencia de otras proteínas de membrana adicionales al RGly típico (Pérez-León y Salceda, 1995).

En primer lugar, detectamos la existencia de 2 sitios de unión para estircinina en cada una de las fracciones sinaptosomales y, si bien la estircinina-³H ha sido el ligando usado tradicionalmente para localizar al RGly en la médula espinal, el tallo cerebral y la retina de diversas clases de vertebrados, no conocemos de algún estudio en el que se detecte la presencia de más de un sitio (Borbe, 1981; Schaeffer and Anderson, 1980; Kessler *et al*, 1989; Young and Snyder, 1973). No obstante, la estircinina presenta una cinética de 2 componentes en la inhibición del RGly en neuronas cultivadas provenientes de la médula espinal de rata (Lewis *et al*, 1993).

Por otra parte, la afinidad en la unión de estircinina-³H en uno de los sitios de las membranas de la fracción sinaptosomal P2 es 10 veces mayor que la que se ha registrado en otros tejidos (ver Introducción, antecedentes, anexo, P2, $K_D = 0.6$ nM, compárese contra el intervalo 4-40 nM en Young y Snyder, 1973, 1974; Ruíz-Gómez *et al*, 1989, 1991). Una afinidad similar se ha encontrado únicamente en las células ganglionares de la retina del ratón mutante *espástico*, en el cual las respuestas glicinérgicas se inhiben por la estircinina con una constante de inhibición de 8 pM (Stone and Pinto, 1992). La mutación del ratón *espástico* consiste en un elemento móvil inserto en el gen de la subunidad β (Mulhardt *et al*, 1994), el efecto de esta mutación es la reducción en la expresión de la subunidad β , ensamblándose menor cantidad de heterolíómeros α/β . Se sabe que afinidad de la estircinina-³H por los heterolíómeros α/β de la médula del ratón *espástico* es la misma que para los heterolíómeros de la médula espinal de los ratones normales, pero el hecho de que la estircinina es mucho más afín por los receptores *en la retina* de este mutante, que tiene una expresión reducida de la subunidad β , concuerda con la alta afinidad de la estircinina-³H que hemos encontrado en la rana, especie que aparentemente carece de subunidades β en la retina.

Miller & Schnellman (1993) han demostrado que las membranas de los túbulos renales del conejo presentan inmunorreactividad sólo para la subunidad β , en dicha preparación la unión de estircinina-³H fue de muy pobre afinidad comparada con la que encontramos nosotros ($K_D = 0.83$ mM vs 0.6 nM en las membranas de P2), ello podría indicar que la carencia de subunidades β , como parece ser el caso para las membranas sinaptosomales P2, propicia que la unión de estircinina-³H sea de muy alta afinidad.

Uno de los sitios de unión de estircinina-³H en la fracción P2 representa al homolíómero α del RGly, falta discernir la identidad del otro sitio, que presenta una afinidad más cercana a la que se ha

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

medido en otras preparaciones (48 nM, Pérez-León y Salceda, 1995, antecedentes, ver anexo compárese con el intervalo 4-40 nM, Young y Snyder, 1973 y 1974; Ruíz-Gómez *et al*, 1991).

Podría ser que la unión de estircina-³H presentara una cinética de 2 componentes por su interacción con proteínas de otros receptores que no sean RGly. En este sentido, se han publicado trabajos en los cuales la estircina actúa sobre otros receptores y canales iónicos en una variedad de preparaciones, como los canales de K⁺ de algunos moluscos, el receptor nicotínico de acetilcolina y el receptor de serotonina en la sanguijuela (recopilado por Barron y Guth, 1987), aunque el efecto de la estircina se ha detectado por registro electrofisiológico, no por unión de ligandos radioactivos.

La sensibilidad farmacológica de la unión de estircina-³H en la retina de la rana puede indicar a qué tipo de proteína se está uniendo el alcaloide, por lo cual realizamos los experimentos de desplazamiento de ligandos radioactivos, que forman parte de esta tesis.

Se ha propuesto que la estircina bloquea al RGly por la interferencia con el canal de Cl⁻ intrínseco (Young y Snyder, 1974), parecía probable que la otra proteína en donde se uniera la estircina-³H en la retina de la rana fuera un canal aniónico, pero el DIDS y el ácido niflúmico, potentes inhibidores de canales aniónicos no desplazaron a la estircina-³H (Resultados, figura 4), de esta forma, concluimos que la estircina-³H no interactúa con un canal aniónico en la retina de la rana. Puesto que tampoco obtuvimos desplazamiento con hexametonio (Resultados, figura 4), descartamos también la posibilidad de que la estircina-³H interactúe con el receptor nicotínico en este tejido.

El desplazamiento por el NBQX en las membranas P2 (Resultados, figura 4) es consistente con la presencia del RGly en estas membranas sinaptosomales, puesto que se ha demostrado que esa droga inhibe la unión de estircina-³H al RGly de la médula espinal de la rata (Pollan y Powell, 1992).

El desplazamiento por 5,7-DCK en las membranas de P2 (Resultados, figura 4) parecería anómala, pero existe un reporte reciente de la inhibición de las respuestas electrofisiológicas de la glicina por parte del 5,7-DCK (Han *et al*, 1997). En el trabajo referido, se registró a la retina de la salamandra y se encontró que la respuesta provocada por la glicina en las células ganglionares (que tienen sus dendritas en la CPI) se inhibió por el 5,7-DCK, el cual se utilizó en concentraciones similares a las de nuestros experimentos. Así, el desplazamiento por NBQX y 5,7 DCK de la unión de estircina-³H, indica que este ligando se une al RGly en las membranas de la fracción sinaptosomal P2 de la retina de la rana. Puesto que es poco probable que estas drogas desplacen a la estircina-³H del sitio de afinidad de 0.6 nM, el segundo sitio de unión de estircina-³H en la fracción P2, con afinidad de 48 nM, es, muy probablemente, un homolígomo de otra isoforma de la subunidad α del RGly.

La unión de estircina-³H en las membranas de la fracción P1 de la retina de la rana presentan también una cinética de 2 componentes (Pérez-León y Salceda, 1995, Introducción, antecedentes, anexo), con K_D 's de 3.9 y 18.7 nM, muy cercanas al intervalo 4-40 nM, medido en otras preparaciones, incluidas las retinas de la rata y de la vaca (Borbe et al, 1980; Ruíz-Gómez *et al*, 1991, Schaeffer y Anderson, 1980; Young y Snyder, 1973 y 1974). Asimismo, fue en esta fracción sinaptosomal en donde la unión de estircina-³H no se desplazó por el NBQX, el 5,7 DCK, el DIDS, el ácido niflúmico y el hexametonio (Resultados, figura 4). De esta manera, propongo que la fracción sinaptosomal P1 presenta homoligómeros α diferentes a los encontrados en la fracción sinaptosomal P2.

La unión de glicina-³H al sitio insensible a estircina en el NMDA_R se ha medido en varias regiones del sistema nervioso central, como el encéfalo y el tallo cerebral (Kishimoto *et al*, 1981; Marvizon *et al*, 1989), y la retina (Boje *et al*, 1992). En estos tejidos se han determinado constantes de afinidad en el intervalo de 40-80 nM, si se comparan con las medidas de nuestros experimentos previos resultan similares (P1= 12 nM, P2= 82 nM, Pérez-León y Salceda, 1995, Introducción, antecedentes, anexo); sin embargo, las diversas drogas que actúan en el sitio de glicina insensible a estircina del NMDA_R no desplazaron a la glicina-³H en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana (ver anexo en antecedentes, Introducción). En esta tesis, en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana no detectamos unión de glutamato-³H desplazable por NMDA ó AP-5 (Resultados, ensayos de unión específica, unión de L-glutamato-³H, figuras 1 y 2, lo que señalaría al NMDA_R). la unión específica de glutamato-³H sólo pudo detectarse desplazando al ligando radioactivo con glutamato, indicando que los sitios específicos de unión a este aminoácido corresponden a receptores tipo no-NMDA (Resultados, ensayos de unión específica, figuras 1 y 2).

Estas características descartan la posibilidad de que, en nuestros experimentos de unión de glicina-³H, estemos midiendo al sitio de glicina insensible a estircina en el NMDA_R. Es de notar que nuestro sistema puede detectar la unión del glutamato-³H al NMDA_R en el tejido en el que se presente, conforme se demostró en las membranas sinaptosomales del telencéfalo de la rata, mediante el aumento causado por la glicina en la unión específica de glutamato-³H, determinada por el desplazamiento por NMDA y AP-5 (Resultados, ensayos de unión específica figura 3).

Si la unión de glicina-³H en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana no representa el sitio del NMDA_R, podría asociarse a alguna isoforma del RGly. Ninguna de las moléculas que desplazaron a la estircina-³H en la fracción P2 tuvo el mismo efecto sobre la unión de glicina-³H. Podría argüirse que la glicina-³H se une a una isoforma del RGly resistente al NBQX y al 5,7 DCK,

como lo hace la estricnina-³H en la fracción P1, no obstante la unión glicina-³H se desplazó por la sarcosina (Resultados, ensayos de unión específica figura 5), una molécula que no tuvo efecto alguno sobre la unión de estricnina-³H.

La sarcosina es un inhibidor del sistema de transporte de alta afinidad de glicina de la membrana plasmática de las neuronas del cerebro de la rata (Smith *et al*, 1993), esta molécula inhibió la unión de glicina-³H en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana (Resultados, figura 5), y quizá pudiera atribuirse este efecto en nuestro tejido a que la unión específica de glicina-³H señalara al transportador de glicina. No obstante, esto no es factible, dado que las condiciones bajo las que se aísla al tejido y las del experimento, que incluyen choque osmótico, centrifugación a alta velocidad, congelación y descongelación del tejido (ver Métodos) son incompatibles con el aislamiento y funcionamiento de un transportador; por el contrario, las condiciones experimentales descritas en los Métodos de esta tesis son las prototípicas para el aislamiento y la medición de receptores de membrana (Unnerstall, 1990).

Siguiendo este argumento, la unión de glicina-³H en las membranas sinaptosomales de la retina de la rana señala la existencia de un receptor de glicina, un receptor del cual puede ser desplazada por la sarcosina, y que es diferente del RGly y del sitio de glicina insensible a estricnina en el NMDA_R.

Inmunohistoquímica

La localización de la gefirina con el mAb 7a (Resultados figura 10) dentro de la capa plexiforme interna (CPI) apoya la presencia del RGly en esta capa de la retina de la rana. La inmunoreactividad difusa indica que las terminales sobre las que se encuentra la gefirina no provienen de un solo tipo neuronal, que se estratificase sobre un estrato restringido de la CPI. Esto sugiere que el RGly es de localización ubicua dentro de esta capa o, alternativamente, que la gefirina puede presentarse sin asociarse al RGly.

Mediante estudios de localización de ácidos nucleicos, se ha detectado al RNA mensajero de la gefirina en homogenados del hígado y el pulmón, así como en diversas zonas del sistema nervioso central en las que no se encuentra ninguna de las otras subunidades del RGly (Prior *et al*, 1992). De hecho se ha demostrado la presencia de la gefirina en asociación con el receptor tipo A del ácido γ -aminobutírico (GABA_AR) en la retina de la rata (Sassoè-Pogneto *et al*, 1995), por lo que su detección no puede considerarse unívocamente asociada a la presencia del RGly. No obstante, nadie ha demostrado que el RGly se presente sin la gefirina, de tal manera que, hasta ahora, la localización de

dicha proteína sigue siendo un indicio de la presencia del RGly, y pensamos que este es el caso en la retina de la rana.

La inmunotransferencia con el uso del mAb 4a (Resultados, figura 7) demostró la carencia de la isoforma β conocida en la retina de la rana, conforme se expuso al inicio de esta sección. En la retina de esta especie, la inmunohistoquímica con el mAb4a mostró un patrón de inmunorreactividad homogénea en la CPI (ver figura 1, Pérez-León y Salceda, 1998, manuscrito inserto en la sección de Resultados) demostrando así, dentro de esta capa de la retina, que las terminales sinápticas en las que se localizan las subunidades α del RGly provienen de neuronas que no siguen un patrón restringido en su estratificación dentro de la CPI.

Un caso contrario es el de la retina de la rata (figura 2, Pérez-León y Salceda, 1998, manuscrito inserto en la sección de Resultados), en la cual se detectaron dos bandas con intensidad mayor en la mitad de la CPI, un patrón de inmunorreactividad que indica la estratificación restringida de alguna de las subunidades que reconoce el mAb 4a. Grünert y Wässle (1993) han demostrado, con el uso de un mAb específico para la subunidad $\alpha 1$ del RGly, que es ésta la que se estratifica restringidamente en los estratos centrales de la CPI. De esta forma se concluye que, en la retina de la rana, las subunidades α del RGly se distribuyen homogéneamente sobre la CPI.

Los anticuerpos policlonales también detectaron a la subunidad α del RGly dentro de la CPI (Pérez-León y Salceda, 1998, figuras 1 y 2, manuscrito inserto en Resultados), un hecho que indica que la localización de las isoformas reconocidas por estos anticuerpos se superpone con las que reconoce el mAb 4a, o alternativamente, que el mAb 4a y los anticuerpos policlonales reconocen a los mismos epítopes. No obstante, ya que los anticuerpos policlonales también marcaron a la CPE, se descarta esta segunda posibilidad, y es más probable que los anticuerpos policlonales reconozcan subunidades α adicionales a las que reconoce el mAb4a y que la distribución de las subunidades se superpone.

A la fecha se piensa la neurotransmisión glicinérgica en la retina de los mamíferos se restringe a la CPI, el que los anticuerpos policlonales Ab 384 y Ab RGly hayan producido reacción en la CPE de la retina de la rata sugiere que la neurotransmisión glicinérgica en los roedores puede ocurrir también en esta capa, lo cual ampliaría la función que se le ha asignado a este aminoácido en la retina de los mamíferos.

Es muy relevante que la inmunorreactividad con el Ab 384 y el Ab RGly incluya, además de la CPE, a las células de Müller, por lo cual decidimos realizar inmunocitoquímica de estas células aisladas.

Los resultados de estos experimentos confirmaron que las células de Müller presentan las isoformas de la subunidad α del RGly que se reconocen por los anticuerpos Ab RGly y Ab 384, (Resultados, figuras 11 y 12). El mAb 4a no produjo reacción, indicando que las isoformas $\alpha 1-\alpha 4$, las que reconoce este anticuerpo monoclonal, no se encuentran en las células de Müller, o que tales isoformas se pierden durante el proceso de aislamiento. La primera posibilidad es más factible, dada la carencia de reactividad del mAb 4a sobre procesos de células de Müller en los cortes de la retina (figuras 1 y 2, Pérez-León y Salceda, 1998, manuscrito inserto en Resultados).

El hecho de que la subunidad α que se presenta en las células de Müller no se reconozca por el mAb 4a origina un problema interesante, puesto que las isoformas que reconoce el mAb 4a son, hasta ahora, todas las caracterizadas para el RGly, lo que implica que en las células de Müller pudiera existir una isoforma α aun no descrita.

¿Cual es el papel del RGly en las células de Müller? Debemos inicialmente mencionar que las células de Müller presentan una isoforma de la subunidad α que parece ser distinta a las que se conocen actualmente. Por otra parte, se sabe que las células de Müller en los anfibios se despolarizan como resultado de la estimulación luminosa, una función probable del RGly en dichas células puede ser contrarrestar tal despolarización.

La transmisión glicinérgica en la retina de *Rana pipiens*

La retina de la rana muestra varias características distintivas, precisamente las que incitan más a su estudio, por ejemplo, las respuestas eléctricas de sus células amacrinas y ganglionares pueden equipararse con las de la corteza visual primaria de los mamíferos (Voaden, 1976). En virtud de que la retina de la rana tiene la misma estructura histológica que la del resto de los vertebrados, la peculiaridad de este tejido debe subyacer en alguna especialización de los sistemas de neurotransmisores. Nuestro trabajo demuestra que el RGly es uno de los receptores que puede presentar esta especialización, en este caso por la presencia exclusiva de homoligómeros α o de heteroligómeros con una subunidad β diferente a la caracterizada actualmente.

En las células ganglionares de la retina de la salamandra se ha demostrado la co-existencia de respuestas glicinérgicas transitorias y sostenidas, éstas últimas más sensibles al 5,7 DCK que a la

estricnina (Han *et al*, 1997). Nuestros datos de unión de ligandos radioactivos señalan también que los sitios de reconocimiento de estricnina-³H son sensibles al desplazamiento por 5,7 DCK, sobre todo en la fracción P2 (Resultados, ensayos de unión específica, figura 4) correspondiente a la CPI, en donde se localizan las dendritas de las células ganglionares. Estos sitios podrían corresponder con las diferentes respuestas glicinérgicas mencionadas, si bien las especies son diferentes, esta particularidad del RGly puede ser común a la clase de los anfibios.

En la CPE de los vertebrados poiquilotermos, la glicina actúa sobre las células horizontales que participan en la generación de las respuestas al color. La glicina ejerce su efecto activando una vía polisináptica que finaliza en una mayor inhibición de las células que se encuentran en el centro del campo receptivo. Al contrario, en la CPI la acción inhibitoria de la glicina sobre las amacrias que liberan GABA resulta en un aumento del nivel de actividad de algunas células bipolares (Pérez-León y Salceda, 1997, Introducción, *La neurotransmisión glicinérgica en la retina de los vertebrados* y referencias incluidas). Es posible que las neuronas que responden a la glicina presenten, en cada caso, isoformas alternas del RGly. El desplazamiento diferencial de la unión de estricnina-³H y, sobre todo, la presencia de isoformas a las que este alcaloide se une con afinidad en el intervalo de concentraciones subnanomolares (P2, $K_D = 0.6$ nM), hacen factible la posibilidad mencionada.

REFERENCIAS

- Aprison, MH (1990) The discovery of the neurotransmitter role of glycine. En: Ottersen, OP y J Storm-Mathisen (eds), *Glycine neurotransmission*, John Wiley & Sons, New York. pp:1-24.
- Barron, SE y Guth, PS (1987). Uses and limitations of strychnine as a probe in neurotransmission. *Trends Pharmacol. Sci.*, 8:204- 206.
- Boje KJ, Skolnick P., Raber J, Fletcher RT y Chader G. (1992). Strychnine insensitive glycine receptors in embryonic chick retina: characteristics and modulation of NMDA neurotoxicity. *Neurochem. Int.*, 20:473-486
- Boos R, Schneider H y Wässle H. (1993) Voltage and transmitter gated currents of AII-amacrine cells in a slice preparation of the rat retina. *J. Neurosci.*, 13:2874- 2888.
- Borbe H, Müller WE y Wöllert U. (1981). Specific strychnine binding associated with glycine receptor in bovine retina. *Brain Res.*, 205:131-139.
- Borges S y Wilson M. (1991). Dual effects of glycine on horizontal cells of the tiger salamander retina. *J Neurophysiol.*, 66:1993-2001.
- Fletcher EJ, PM 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 AC. y Kemp AJ. (1989) HA-966 antagonizes NMDA receptor through a selective interaction with the glycine modulatory site. *J. Neurosci.*, 9:2191-2196.
- Fricke U. (1975). A new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Analyt. Biochem.*, 63:555-558.
- Gilbertson TA, Borges S y Wilson M. (1991) The effects of glycine and GABA on isolated horizontal cells from tiger salamander retina. *J. Neurophysiol.*, 66:2002-2013.
- Greferath U, Brandstätter JH, Wässle H., Kirsch, J, Kuhse J. y Grünert U. (1994) Differential expression of glycine receptors subunits in the retina of the rat: a study using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Visual Neurosc.*, 1:721-729.
- Grünert U y Wässle H (1993) Immunocytochemical localization of glycine receptors in the mammalian retina. *J Comp Neurol*, 335:523-537.
- Han Y, Zhan J y Slaughter MM, 1997 Partition of transient and sustained inhibitory glycinergic input to retinal ganglion cells, *J Neurosci.*, 17:3392-3400.
- Hurt SD y Baron BM (1991) 3H-5,7-dichlorokynurenic acid, a high affinity ligand for the NMDA receptor glycine regulatory site. *J. Receptor Res.*, 11:215-220.
- Jager J y Wässle H (1987) Localization of glycine uptake and receptors in the cat retina. *Neurosci Lett*, 75:147-151.

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

Kessler M, Terramani T, Lynch G y Baudry M. (1989) A glycine site associated with NMDA receptor: characterization of a new class of antagonists. *J. Neurochem.*, 52:1319-1328.

Keirstead, SA y Miller RF. (1995) Calcium waves in dissociated retinal glial (Müller) cells are evoked by release of calcium from intracellular stores. *Glia*, 14:14-22.

Kirchhoff F, Müllhardt C, Pastor A, Becker C-M y Kettenmann H (1996) Expression of glycine receptor subunits in glial cells of the rat spinal cord. *J Neurochem*, 66:1383-1390.

Kirsch J y Betz H (1995) The postsynaptic localization of the GlyR associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci*, 15:4148-4156.

Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B. y Betz H (1991) The 93 kDa glycine receptor associated-protein binds to tubulin. *J Biol. Chem.*, 266:22242-22245.

Kishimoto H, Simon JR y Aprison MH (1981) Determination of the equilibrium dissociation constants and number of glycine binding sites in several areas of the rat central nervous system. *J. Neurochem.*, 37:1015-1024.

Kleckner NW y Dingledine R. (1989) Selectivity of quinoxalines and kynurenes as antagonists of the glycine site on the NMDA receptors. *Mol. Pharmacol.*, 36:430-436.

Kuhse J, Schmieden V y Betz H. (1990) A single amino acid exchange alters the pharmacology of neonatal rat glycine receptor subunit. *Neuron*, 5:867-873.

Langosch D; Betz H y Becker CM (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.

Lewis CA, Ahmed Z y Faber DS (1989) Characteristics of glycine activated conductances in cultured medullary neurons from embryonic rat. *Neurosc. lett.*, 96:185-190.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.

Marc RE. (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.

Marvizon JC, Lewin AH y Skolnick P. (1989) 1-amino-cyclo-propan-carboxylic acid: a potent and selective ligand of the glycine modulatory site of the NMDA receptor complex. *J. Neurochem.*, 52:992-994.

Marvizon JC, Vazquez J, Garcia-Calvo M, Mayor Jr. F., Ruiz-Gomez A, Valdivieso F. y Benavides (1986) The glycine receptor: pharmacological studies and mathematical modelling of the allosteric interaction between glycine and strychnine-binding sites. *J. Mol. Pharmacol.*, 30:590-597.

Miller GW y Schnellman RG. (1993) A novel low affinity strychnine binding site on renal proximal tubules: role in toxic cell death. *Life Sci.*, 53:1203-1209.

Miller GW y Schnellman RG (1994) A putative cytoprotective receptor in the kidney: relation to the neuronal strychnine-sensitive glycine receptor. *Life Sci.*, 55:27-34.

Mulhardt C, Fischer M, Gass P, Simon-Chazottes, Guenet JL, Kuhse J, Betz H, Becker C-M (1994) The spastic mouse: aberrant splicing of glycine receptor β subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element. *Neuron*, 13:1003-1015.

Newman EA (1993) Inward rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci.*, 13:3333-3345.

Pan ZH y Slaughter MM.(1995) Comparison of the actions of glycine and related aminoacids on isolated third order neurons from the tiger salamander retina. *Neuroscience*, 64:153-164.

Pastor A, Chvátal A, Sykova E, Kettenmann H. (1995) Glycine and GABA-activated currents in identified glial cells of the developing rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, 7:1188-1198.

Pérez-León JA and Salceda R. (1995) Different specific binding sites of 3H-Glycine and 3H-Strychnine in synaptosomal membranes isolated from frog retina. *Neurochem. Res.*, 20: 915-922,

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

Pourcho, RG y Goebel DJ. (1990) Autoradiographic and Immunocytochemical studies of glycine-containing neurons in retina. In: Ottersen, O. P. and Storm-Mathisen, J. (eds). *Glycine Neurotransmission*, John Wiley & Sons, England:355-391.

Prior P, Schmit B, Grenningloh G, Prübilla I, Mutthaup G, Beryreuther K, Maulet Y, Werner P, Langosch D, Kirsch J y Betz, H. (1992) Primary structure and alternative splicing variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron*, 8:1161-1170.

Pollau, LM y Powell RJ. (1992) Comparison of binding at the strychnine sensitive (inhibitory glycine receptor) and strychnine insensitive (NMDA receptor) glycine binding. *Neurosc. lett.*, 148: 199-201.

Rauen, T, Rothstein JD y Wässle, H (1996) Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell. Tissue Res.*, 286:325-336.

Ruiz-Gomez A , Vaello ML, Valdivieso F y Mayor Jr F. (1991) Phosphorylation of the 48 kDa of the GlyR by protein kinase-C. *J. Biol. Chem.*, 266:559-566.

Ruiz-Gomez A, Garcia-Calvo M, Vazquez J, Marvizon JC y Mayor Jr F. (1989) *J. Neurochem.*, 52:1775-1780.

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

Saransaari PJ y Oja SS. (1993) Strychnine-insensitive glycine binding to cerebral cortical membranes in developing and ageing mice. *Mechanisms Ageing Devepl.* 72: 57-66.

Sassoè-Pognetto M, Kirsch J, Grünert U, Greferath U, Frittsch JM, Möhler H, Betz H and Wässle H. (1995) Co-localization of gephyrin and GABA_A receptors subunits in the rat retina. *J Comp. Neurol.* 357:1-14.

Schaeffer JM y Anderson S. (1980) Identification of strychnine binding sites in the rat retina. *J. Neurochem.*, 36:1597-1600.

Schröder S, Hoch W, Becker C-M, Grenningloh G, Betz, H (1991) Mapping of antigenic epitopes on the $\alpha 1$ subunit of the inhibitory GlyR. *Biochem.*, 30:42-47.

Semple-Rowland SL. (1991) Expression of GFAP by Müller cells in *rd* chick retina. *J. Comp Neurol.*, 305:582-590.

Smiley JF y Yazulla S. (1990) Glycinergic contacts in the outer plexiform layer of the *Xenopus laevis* retina characterized by antibodies to glycine GABA and glycine receptor. *J. Comp. Neurol.*, 299:375-388.

Smith K, Borden LA, Hartig PR, Branchek T y Weinshank, RL. (1992) Cloning and expression of a glycine transporter reveal co-localization with NMDA receptors. *Neuron*, 8:927-935.

Stockton RA y Slaughter MM. (1991) Depolarizing actions of GABA and glycine on amphibian horizontal cells. *J. Neurophysiol.*, 65:680-692.

Stone C y Pinto L. (1992) Receptive field organization of retinal ganglion cells in the spastic mutant mouse. *J Physiol.*, 956:125-142.

Stone C y Pinto L. (1993) Response properties of ganglion cells in the isolated mouse retina. *Visual Neurosci.*, 10:31-39.

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

Vandenberg RJ, French CR, Barry PH, Shine J y Schofield PR. (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.

Voaden MJ (1976). Gamma aminobutyric acid and glycine as retinal transmitters. In Bonting, S. L. (Ed) *Transmitters in the visual process*. Great Britain: Oxford. University Press: 107-126.

Wässle H y Boycott BB (1991) Functional architecture of mammalian retina. *Physiol. Rev.*, 71:447-480.

Yang X-L y Wu S. (1989) Effects of GABA on the horizontal cells in the tiger salamander retina. *Vision Res.*, 33:1339-1344. (1989).

Yazulla S y Studholme KM. (1991) Glycine receptor immunoreactivity in retinal bipolar cells is postsynaptic to glycinergic and GABAergic amacrine cell synapses. *J Comp. Neurol.*, 310: 11-20.

Young AB y Snyder SH. (1973) Strychnine binding associated with glycine receptor of the central nervous system. *Proc. Natl Acad. Sc. U.S.A.*, 70:2832-2836.

Young AB y Snyder SH. (1974) The glycine synaptic receptor: evidence that strychnine binding is associated with the ionic conductance mechanism. *Proc. Natl Acad. Sc. U.S.A.*, 71:4002-4005.